

BEST AVAILABLE COPY

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年2月15日 (15.02.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/11044 A1

- (51)国際特許分類7: C12N 15/12, C07K 14/82, 7/00, A61K 39/00, 39/395, 48/00, 45/00, A61P 35/00, A61K 38/10, G01N 33/50, 33/15
- (21)国際出願番号: PCT/JP00/05220
- (22)国際出願日: 2000年8月3日 (03.08.2000)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願平11/222101 1999年8月5日 (05.08.1999) JP
- (71)出願人および
(72)発明者: 伊東恭悟 (ITOH, Kyogo) [JP/JP]; 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目 25番地9号 Saga (JP).
- (74)代理人: 庄司 隆 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目9番9号 第一瀬野ビル1階 Tokyo (JP).
- (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: TUMOR ANTIGEN

(54) 発明の名称: 腫瘍抗原

(57) Abstract: A tumor antigen peptide capable of inducing and/or activating HLA-A24 restraint and/or HLA-A2 restrain tumor-specific cytotoxic T cells; a polynucleotide encoding this peptide or its complementary strand; a recombinant vector containing this polynucleotide; a transformant containing this recombinant vector; a process for producing the peptide; an antibody against the peptide; a compound undergoing interactions with these substances; a method of screening the compound; medicinal compositions with the use of these substances; and a means of diagnosing by using the same.

(57) 要約:

HLA-A24拘束性および/またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化しうる腫瘍抗原ペプチドを見いだし、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組み換えベクターを含む形質転換体、ペプチドの製造方法、ペプチドに対する抗体、これらに対して相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段を提供する。

WO 01/11044 A1

WO 01/11044 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

腫瘍抗原

技術分野

5 本発明は、新規な腫瘍抗原に関し、詳しくは腫瘍特異的細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド、そのペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組換えベクターを含む形質転換体、ペプチドの製造方法、ペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断のための分析手段に関する。

従来技術

生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性T細胞（Cytotoxic T Lymphocyte：以下、CTLと略称することもある）が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性T細胞の浸潤が認められている（Arch. Surg., 126: 200-205, 1990）。この腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞の標的分子である腫瘍抗原の発見は、メラノーマにおいて初めてなされた。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて8～11個のアミノ酸からなるペプチド（腫瘍抗原ペプチド）になり、主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen：以下、HLAと略称する）分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。

HLAは細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。HLAはクラスI抗原とクラスII抗原に大別されるが、細胞傷害性T細胞により抗原ペプチドとともに認識されるHLAはクラスI抗原である。HLAクラスI抗原はさらにHLA-A、B、Cなどに分類され、その遺伝子には多型が存在することが報告されている。HLA-A24対立遺伝子（allele）は、日本人の

人口の約 60%（多くはその 95% の遺伝型が A2402 である）、コーカサス人の 20%、アフリカ人の 12% でみられる。HLA-A2 対立遺伝子は、日本人の約 40%、中国人の 53%、北コーカサス人の 49%、南コーカサス人の 38%、黒人アフリカ人の 23% においてみられる。

この HLA に結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、HLA の型 (type) ごとにその配列に規則性 (モチーフ) がある。細胞傷害性 T 細胞はこの腫瘍抗原ペプチドと HLA との複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。ここにおいて、腫瘍抗原とは、腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導しうる、腫瘍細胞が有する蛋白質またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、該腫瘍抗原が腫瘍細胞内で分解されて生じるペプチドであり、HLA 分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導または活性化しうるペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導しうるアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ（腫瘍抗原決定基）という。

近年、細胞傷害性 T 細胞により認識されうる腫瘍抗原をコードする多くの遺伝子が、ヒトの癌細胞の cDNA から同定されている (Science, 254: 1643~1647, 1991) (J. Exp. Med., 183: 1185~1192, 1996)。これらは、HER/neu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 432~436, 1995)、変異 cdk (Science, 269: 1281~1284, 1995)、そして変異 CASP-8 (J. Exp. Med., 186: 785~793, 1997) などであり、増殖性細胞および悪性形質転換体中の存在が認められている。MAGE (メラノーマ抗原) ファミリー (Cancer Res., 55: 3478~3482, 1995) や SART1 (J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998) などの他のいくつかの遺伝子産物は、悪性細胞と精巣の両方で選択的に発現しているが、その他の正常細胞では発現していない。

多くのメラノーマ特異的な腫瘍抗原は、MART-1/melanA、gp100、およびチロシナーゼなどであり、これらは正常メラニン細胞にも存在する

(Oncogene Res., 1:357~374, 1987)。それゆえ、ヒトの腫瘍抗原はほとんどの場合、真に腫瘍特異抗原というのではなく、むしろそれらはいくつかの正常細胞や組織で発現する自己抗原といえる。

現在、欧米では、腫瘍抗原ペプチドを投与し、癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2(IL-2)を静脈注射投与することにより、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(Nature Medicine, 4:321, 1998)。このように、腫瘍抗原はワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

しかしながら、同定されている腫瘍抗原はそのほとんどがメラノーマ由来であり、発病頻度の高い上皮性の癌や腺癌由来の腫瘍抗原についての報告は少ない。

既存の三大癌治療(手術療法、化学療法、および放射線治療)による1998年における5年生存率は全癌で41%であるが、生存率をこれ以上増加させることは現状では難しく、上記三大治療法に加え新たな治療法の開発が望まれている。

srcファミリー膜型チロシンキナーゼの1つであるp56^{lck}蛋白質をコードするlck遺伝子は、T細胞の発生と機能において本質的な機能を有する。このlck遺伝子の大腸癌細胞と小細胞性肺癌細胞における異常な発現(Oncogene Res., 1:357~374, 1987)、および転移性大腸癌での異所性発現が報告されている。また、腫瘍性形質転換の過程におけるLck蛋白質の関与が示唆されてはいる(Cancer Res., 58:4660~4666, 1998)が、しかしながら、これらの癌細胞におけるLck蛋白質の詳細な役割は知られていない。

発明の開示

本発明は上記現状に鑑み、腺癌および上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を見いだし提供することを目的とする。

- 5 具体的には、少なくともHLA-A2402拘束性またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞により認識される、lck遺伝子がコードする抗原エピトープを有するペプチドを見いだし、提供することが本発明の目的である。詳しくは、HLA-A2402拘束性またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその
10 相補鎖、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドの製造方法、該ペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段を提供することを目的とする。

課題解決のため、本発明者は、HLA-A24と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2402拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞であるKE4-CTL、ならびにHLA-A2と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞であるOK-CTLおよびGK-CTLを癌患者から樹立し、この腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法(Gene Expression Cloning Method)を用いて、KE腫瘍細胞株のcDNAライブラリーから同定し、さらにHLA-A2402拘束性および/またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞により認識される該腫瘍抗原のエピトープを有するペプチドを見いだし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- 25 (1) 配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、
配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号11、配列
番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、

または配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(2) 下記の式で表されるアミノ酸配列（配列表の配列番号 10）からなるペプチド、

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

5 ここで、 Xaaは、 AspまたはGlu、

Xbbは、 TyrまたはPhe、

Xccは、 LeuまたはIle、

Xddは、 ArgまたはGln、

Xeeは、 SerまたはAla、

10 Xffは、 ValまたはPhe、

Xggは、 GluまたはAsp、

Xhhは、 PheまたはTyr、

Xiiは、 PheまたはTyrである、

(3) 少なくとも前記 (1) または (2) のペプチドからなる細胞傷害性 T 細胞
15 の誘導剤、

(4) 前記 (1) または (2) のペプチドを用いることを特徴とする細胞傷害性
T 細胞の誘導方法、

(5) 少なくとも前記 (1) または (2) のペプチドからなる癌ワクチン、

(6) 前記 (1) または (2) のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは
20 その相補鎖、

(7) 前記 (6) のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジエントな条
件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

(8) 前記 (6) または (7) のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する
組換えベクター、

25 (9) 前記 (8) の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 前記 (9) の形質転換体を培養する工程を含むペプチドの製造方法、

(11) 前記 (1) または (2) のペプチドを免疫学的に認識する抗体、

- (12) 前記(1)または(2)のペプチドと相互作用して、少なくとも HLA-A2402 拘束性および/または HLA-A2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞による認識性を増強する化合物、および/または前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、前記(1)もしくは(2)のペプチド、前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチド、前記(8)の組換えベクター、前記(9)の形質転換体、または前記(11)の抗体のうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、
(13) 前記(12)のスクリーニング方法で得られた化合物、
(14) 前記(1)もしくは(2)のペプチド、前記(6)もしくは(7)のポリヌクレオチド、前記(8)の組換えベクター、前記(9)の形質転換体、前記(11)の抗体、または前記(13)の化合物のうちの少なくとも 1 つを癌治療有効量を含んでなる癌治療に用いる医薬組成物、
(15) 前記(3)の細胞傷害性 T 細胞の誘導剤、前記(5)の癌ワクチン、または前記(14)の医薬組成物を癌疾患に用いることを特徴とする治疗方法、
(16) 前記(1)または(2)のペプチドの発現または活性に関連した疾病的診断方法であって、(a) 該ボリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および/または(b) 個体由来の試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む方法、
(17) 前記(16)の方法に使用する試薬キットであって、少なくとも前記(1)または(2)のペプチド、前記(6)または(7)のポリヌクレオチド、前記(11)の抗体のうちの 1 つ以上からなる試薬キット、
からなる。

図面の簡単な説明

図 1 : lck 遺伝子産物を認識することにより、HLA-A24 拘束性細胞傷

害性T細胞（KE 4-CTL）が活性化しインターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生することを示す図である。

図2： Lck遺伝子産物を認識することにより、HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞が活性化してインターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生することを示す図である。（A）、（B）および（C）はそれぞれHLA-A2拘束性CTLとして、OK-CTL-e亜株、GK-CTL2-2-4亜株およびGK-CTL2-2-5亜株を用いたときの結果を示す。

図3： Lck由来のペプチドをトランスフェクションしたC1R/A2402細胞で刺激したKE-CTLからのIFN- γ 産生量を示す図である。

図4： Lck由来のペプチドが濃度依存的にKE-CTLを活性することを示す図面である。

図5： KE-CTLによるペプチド認識を種々の抗体存在下で行い、KE-CTLの細胞表現型（phenotype）およびMHC拘束性を確認した結果を示す図である。（A）、（B）および（C）はそれぞれLck由来のペプチドとして、Lck208-216、Lck486-494、およびLck488-497を用いたときの結果を示す。

図6： KE4-CTL亜株（subline）のペプチド認識における差違を示す図面である。（A）、（B）、（C）および（D）はそれぞれ亜株#19、亜株#49、亜株#93、およびクローン#80を用いた結果を示す。

図7： Lck由来のペプチドが癌患者末梢血単核球（PBMC）からHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導しうることを、各種腫瘍細胞、KE4（HLA-A24 $^+$ ）、SW620（HLA-A24 $^+$ ）、COLO201（HLA-A24 $-$ ）を標的細胞としてCTLからのIFN- γ 産生を指標に調べた結果を示す図である。

図8： Lck由来ペプチドにより誘導されるCTLの各種腫瘍細胞に対する細胞傷害性活性を、 ^{51}Cr の遊離試験により検討した結果を示す図である。（A）および（B）は、ペプチドとしてそれぞれLck488-497およびLck20

8-216を使用した結果を示す。

図9：大腸癌患者の末梢血単核球（PBM C）からペプチドにより誘導されたCTLの、ペプチドに対する特異性を示す図である。（A）、（B）、（C）および（D）は、それぞれ癌患者のPBM Cの事前刺激に、ペプチドを使用しなかつたとき、ペプチドとしてLck208-216、Lck486-494、およびLck488-497を使用したときの結果を示す。
5

図10：大腸癌患者の末梢血単核球（PBM C）からのペプチドによるCTL誘導を種々の抗体存在下で行い、誘導されたCTLの細胞表現型（phenotype）およびMHC拘束性を確認した結果を示す図である。
10

図11：大腸癌患者の末梢血単核球（PBM C）中の、ペプチドにより誘導されるCTL前駆細胞の頻度を示す図である。図中、横軸は1ウエルあたりの加えたCTL数を表し、縦軸は増殖陰性分画（fraction negative culture）を表す。縦軸において、1はCTLが誘導されず、CTLにより溶解（lysis）されるべき標的細胞が100%生存していることを示し、
15 0.2は標的細胞が100%死滅している（CTL前駆細胞頻度=1/96）ことを示す。

図12：Srcファミリー由来のペプチドによる、KE4-CTLの活性化を示す図である。

図13：Lck由来のペプチドのHLA-A2拘束性CTL活性化能を分析した結果を示す図であり、（A）はHLA-A2拘束性CTLとしてOK-CTL株を使用したときの結果を、（B）はGK-CTL2-2-4亜株を使用したときの結果を示す。
20

図14：Lck由来のペプチドが濃度依存的にHLA-A2拘束性CTLを活性化することを示す図である。（A）、（B）および（C）は、それぞれOK-CTL-e亜株、GK-CTL2-2-4亜株、およびGK-CTL2-2-5亜株をCTLとして使用したときの結果を示す。
25

図15：Lck由来のペプチドが癌患者末梢血単核球（PBM C）からHLA

－ A 2 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導しうることを示す図である。 (A) および (B) は、大腸癌患者例 1 由来の P B M C からの C T L の誘導を、 I F N - γ の產生を指標に検討した結果、および細胞傷害性試験で確認した結果を示す。 (C) および (D) は、大腸癌患者例 2 由来の P B M C からの C T L の誘導を同様に検討した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

(l c k 遺伝子の同定)

本発明者らは、まず日本人の多数においてみられる H L A - A 分子の型である H L A - A 2 4 に着目し、この H L A - A 2 4 と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化される H L A - A 2 4 0 2 拘束性腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (K E 4 - C T L) を、食道癌患者から樹立した (I n t . J . C a n c e r , 8 1 : 4 5 9 - 4 6 6 , 1 9 9 9) 。この細胞傷害性 T 細胞をエフェクターとして使用し、この細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、 K E 腫瘍細胞株の c D N A ライブラリーから同定した。細胞傷害性 T 細胞の活性化の判定は、酵素免疫固相法 (E L I S A) キットを用いて、該細胞傷害性 T 細胞から產生されるインターフェロン - γ (I F N - γ) を測定することにより行った。その結果、1つの c D N A クローンが H L A - A 2 4 拘束性 K E 4 - C T L により認識され、該 K E 4 - C T L を活性化すること (図 1 参照) 、およびこの c D N A クローンの塩基配列が 1, 7 5 0 塩基 (b p) 長であり、かつ l c k 遺伝子の塩基配列におけるポジション 2 8 3 - 2 , 0 3 2 と 1 0 0 % 相同性を有することを見いだした。このポジションの l c k 遺伝子の塩基配列は、 5 0 9 アミノ酸からなる L c k 蛋白質においてその大部分を含むポジション 3 1 - 5 0 6 のアミノ酸配列に対応する。

すなわち、 L c k 遺伝子と H L A - A 2 4 0 2 とを遺伝子工学的手法により発現させた細胞が K E - C T L を活性化せしめることから、 L c k 遺伝子がコードする蛋白質は、 H L A - A 2 4 0 2 拘束性 C T L を活性化しうる腫瘍抗原である

ことを確認した。

また、Lck蛋白質は、HLA-A24拘束性CTLのみならず、HLA-A2拘束性CTLをも活性化しうる腫瘍抗原であることを、大腸癌患者より樹立したCTL株[OK-CTL-e亜株(subline)(HLA-A0207)]
5 (J. Immunol.、163:4999-5004、1999)および肺癌患者より樹立したCTL株[GK-CTL2-2-4亜株およびGK-CTL2-2-5(HLA-A0206)]の3つのHLA-A2拘束性CTLを用いて上記同様に見いだした(図2参照)。

かくして、Lck遺伝子が、HLA-A24拘束性またはHLA-A2拘束性
10 の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原エピトープ(tumor epitope)をコードすることを見いだした。

(Lck蛋白質の組織局在)

種々の細胞および組織における蛋白質レベルでのLck(56kDおよび59
15 kD)の発現を、抗Lckモノクローナル抗体を用いてウェスタンプロット分析により検討した。

Lck蛋白質は、扁平上皮癌(以下、SCCと略称することもある)または腺腫瘍細胞株などの試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食道癌、肺SCCおよび肺腺癌細胞などの、多種の臓器から得た新鮮腫瘍組織の大多数で検出された。
20 特に、Lck蛋白質は大腸癌、肺癌、食道癌の組織で、高率に発現していた。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなかった。また、Lck蛋白質は未刺激の末梢血単核球(PBMC)では認められなかつたが、10μg/mlのフィトヘマグルチニン(phytohemagglutinin; PHA)で48時間刺激した後の活性化されたPBMC(PHA-blast)の細胞質
25 画分には検出されるようになった。

(HLA-A2402拘束性CTLを活性化しうるペプチド)

Lck蛋白質由来のHLA-A2402分子への結合能を有するペプチドを得るために、HLA-A24に結合しうる規則的配列（モチーフ、motif）を有するペプチドについて文献検索し、13個の異なる9-merまたは10-merのペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列（Nature、319：682～685、1986）に基づいて合成した。但し、一部のアミノ酸に変更を加えたものもある。

13個のペプチドからの細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原ペプチドの選択は、CTLが産生するIFN- γ をそのCTL活性化作用の指標として測定することにより行った。

これらのペプチドのうち、3個のペプチド〔Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）〕がCTL活性化能を示し、CTLによるIFN- γ 産生を増強した（図3参照）。Lck486-494（配列番号1）またはLck488-497（配列番号2）のCTL活性化能は濃度依存的であり、1nM程度で認められた。一方、Lck208-216（配列番号3）の活性は100nM以上で認められた（図4参照）。

これら3個のペプチドによるKE4-CTLの活性化は、抗CD3、抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗CD4、抗MHCクラスIIおよび抗CD13モノクローナル抗体では阻害されなかった。従って、KE4-CTLはCD3 $^+$ 、CD8 $^+$ 、CD4 $^-$ の細胞表現型を有することが判明した。

(ペプチドによるHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

HLA-A24拘束性のKE-CTLを濃度依存的に活性化する3個のペプチド〔Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）〕はまた、大腸癌患者から得た末梢血単核

球 (P B M C) から、L c k を発現している腫瘍細胞株 (K E 4、S W 6 2 0 およびC O L O 2 0 1) に対するH L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導した。

すなわち、L c k 2 0 8 - 2 1 6 (配列番号3)、L c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号1)、L c k 4 8 8 - 4 9 7 (配列番号2) を用いて*in vitro*で
5 3回刺激し、さらに放射線照射した自己P B M C (*autologous*-P B M C) を相当するペプチドでバルスしたものを抗原提示細胞 (A P C) として用いて刺激したとき、特にL c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号1)、L c k 4 8 8 -
4 9 7 (配列番号2) で刺激したP B M Cは、H L A - A 2 4 ⁻腫瘍細胞 (C O
10 L O 2 0 1) に対する反応より、H L A - A 2 4 ⁺腫瘍細胞 (K E 4 およびS W
6 2 0) に対する反応においてより多くのI F N - γ を産生した。

一方、健常人から得たP B M Cからは、抗原提示細胞 (A P C) として放射線照射した自己P B M Cに3個のペプチドのいずれかをバルスしたものを用いて刺激したときは、これら3個のペプチドはH L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導しなかった (表3参照)。しかし、ペプチドをバルスした樹状細胞 (D e n d r i t
15 i c C e l l ; D C) をA P Cとして用いて刺激したときには、これら3個のペプチドは健常人から得たP B M Cから、H L A - A 2 4 拘束性 C T L を誘導した。

さらに、上記ペプチドが誘導したC T L 活性を、⁵¹C r 遊離試験により確認した。これらL c k 由来の3個のペプチドで刺激したP B M Cは、H L A - A 2 4
20 ⁺ K E 腫瘍細胞およびS W 6 2 0 腫瘍細胞を溶解 (l y s i s) したが、健常人から得たH L A - A 2 4 ⁺ P H A 活性化T細胞またはH L A - A 2 4 ⁻ C O L O
2 0 1 腫瘍細胞はいずれも溶解しなかった。

L c k 由来の上記ペプチドは大腸癌患者のP B M CにおいてH L A - A 2 4 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができた。また、L c k 由来のペプチドは、健常人のP B M Cについては、腫瘍細胞に対するH L A - A 2 4
25 拘束性のC T L 活性を誘導できなかった。これらの結果から、健常人の末梢血中のT細胞はL c k に対して免疫学的寛容状態にあると考えられる。本発明のL c

kペプチドは大腸癌患者のPBM C中にCTLを誘導することができる。

(Srcファミリー由来のペプチドによるHLA-A24拘束性CTLの誘導)

HLA-A24⁺腫瘍細胞株を認識するCTLを誘導することができる上記3

5 個のペプチドのうち、2個のペプチドLck486-494（配列番号1）（T
FDYLRSQL）およびLck488-497（配列番号2）（DYLRSV
LED F）に、アミノ酸配列上の相同性が認められた。（以降、アミノ酸配列を
表記する場合、1文字にて表記する場合と3文字にて表記する場合がある。）
この2個のペプチドの重なる領域である一定のアミノ酸DYLRSVをエピトー
10 プとして認識するCTLは、腫瘍拒絶に対する意義を有することが推定される。

このアミノ酸配列に相同性をもつペプチドを検索したところ、Lckと同じSrc
ファミリーに属するチロシンキナーゼ（Ann. Rev. Biochem.
54:897-930, 1985）に、相同性を有するペプチドを含むものがあ
ることが判明した（表5参照）。

15 これらSrcファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成したペ
プチド、Src511-519（配列番号4: TFEYLQAF L）、Yes5
08-516（配列番号5: TFEYIQSFL）、Fyn512-520（配
列番号6: TFEYLQSFL）、Lyn489-497（配列番号7: TFD
YLQSVL）、Hck503-511（配列番号8: TFEYIQSVL）、
20 Blk482-490（配列番号9: TFEFLQSVL）も、Lck由来のペ
プチドと同様、あるいはそれ以上のHLA-A24拘束性CTL活性化能を示し
た。

上記相同性を有するペプチドのアミノ酸配列から導き出される、下記の一般式
で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであって、かつ少なくともHLA-A
25 2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチドも、本発明のペ
プチドに含まれる。

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

ここで、Xaaは、AspまたはGlu、

Xbbは、TyrまたはPhe、

Xccは、LeuまたはIle、

5 Xddは、ArgまたはGln、

Xeeは、SerまたはAla、

Xffは、ValまたはPhe、

Xggは、GluまたはAsp、

Xhhは、PheまたはTyr、

10 Xiiは、PheまたはTyr、

である。

(S r c ファミリー由来のペプチドによる癌患者における H L A - A 2 4 拘束性細胞傷害性 T 細胞の誘導)

15 上記 S r c ファミリー由来のペプチドは、癌患者より得た P B M C から H L A - A 2 4 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導することができた。すなわち、S r c ファミリー由来のペプチドで刺激した癌患者より得た P B M C は、K E 4 細胞および S W 6 2 0 細胞に対して反応し、I F N - γ を産生した。L c k 4 8 6 - 4 9 4 (配列番号 1) は癌患者 7 例中 4 例、S r c 5 1 1 - 5 1 9 (配列番号 4) は 20 3 例中 2 例、Y e s 5 0 8 - 5 1 6 (配列番号 5) は 3 例中 1 例、F y n 5 1 2 - 5 2 0 (配列番号 6) は 2 例中 1 例、H c k 5 0 3 - 5 1 1 (配列番号 8) は 2 例中 2 例、B l k 4 8 2 - 4 9 0 (配列番号 9) は 2 例中 1 例において、P B M C からの I F N - γ を産生を誘導した。

25 本発明の 3 個の L c k ペプチドおよび S r c ファミリー由来のペプチドは、大腸癌患者の P B M C において H L A - A 2 4 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導することができる。従って、本発明のペプチドは、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導剤および誘導方法に使用可能である。また、L c k は大腸、肺お

よび食道を含む大多数の癌組織で検出される。HLA-A24対立遺伝子 (allele) は日本人の人口の約60% (多くは、その95%の遺伝型がA2402である)、コーカサス人の20%、アフリカ人の12% (HLA 1991, Vol. 1 : 1065~1220, Oxford : Oxford Scientific Publications, 1992) で見られる。従って、本発明のペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

(HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞を活性化しうるペプチド)

つぎに、Lck蛋白質がHLA-A2拘束性CTLによっても認識されることから、HLA-A2分子への結合能をもつLck由来のペプチドを得るために、HLA-A2に結合しうるモチーフを有するペプチドについて文献検索し、24種の異なる9-merまたは10-merのペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列 (Nature, 319 : 682~685, 1986) に基づいて合成した。CTLとしてOK-CTL株またはGK-CTL亜株 (subline) 2-2-4を用い、各ペプチドのCTL活性化能は、CTLが產生するIFN- γ を指標として測定した。

これらのペプチドのうち、7個のペプチド [Lck 61-69 (配列番号11)、Lck 246-254 (配列番号12)、Lck 294-303 (配列番号13)、Lck 340-348 (配列番号14)、Lck 347-355 (配列番号15)、20 Lck 422-430 (配列番号16)、Lck 492-500 (配列番号17)] がCTL活性化能を示し、CTLによるIFN- γ 産生を増強した [図13の(A) および(B) 参照]。Lck 61-69 (配列番号11)、Lck 246-254 (配列番号12)、またはLck 422-430 (配列番号16) の、CTL活性化能は濃度依存的であった [図14の(A)、(B) および(C) 参照]。

(ペプチドによるHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

また、HLA-A2拘束性のCTLを濃度依存的に活性化する3個のペプチド

〔Lck61-69（配列番号11）、Lck246-254（配列番号12）、
Lck422-430（配列番号16）〕のうち、Lck246-254（配列
番号12）またはLck422-430（配列番号16）は、転移性大腸癌患者
のPBMCから、腫瘍細胞株であるPanc-1、SW620に対するHLA-
5 A2拘束性CTLを誘導した。

すなわち、転移を有する大腸癌患者のPBMCをこれら3個のペプチドのいず
れかでin vitroで3回刺激し、さらに放射線照射した自己PBMC（a
utologous-PBMC）を相当するペプチドでパルスしたものを抗原提
示細胞（APC）として用いて刺激したとき、Lck246-254（配列番号
10 12）、Lck422-430（配列番号16）で刺激した該大腸癌患者のPB
MCは、HLA-A2⁻大腸癌細胞株COLO320に対して反応しなかったが、
HLA-A2⁺大腸癌細胞株SW620やHLA-A2⁺肺臓癌細胞株Panc
-1に反応してIFN-γを産生し〔図15の（A）および（C）参照〕、HL
A-A2⁺腫瘍細胞を溶解した〔図15の（B）および（D）参照〕。
15

（癌患者におけるHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞の誘導）

Lck246-254（配列番号12）およびLck422-430（配列番
号16）は、大腸癌患者だけではなく、転移を有する肺癌患者および食道癌患者
より得たPBMCからHLA-A24拘束性CTLを誘導することができた。H
20 LA-A2拘束性CTLの誘導は、HLA-A2⁺大腸癌細胞株SW620に対
するIFN-γの産生を指標にして測定した。Lck246-254（配列番号
12）は癌患者6例中2例、Lck422-430（配列番号16）は6例中3
例において、PBMC中にHLA-A2拘束性のCTLを誘導した（表8参照）。
従って、これら3個のペプチドは、細胞傷害性T細胞の誘導剤および誘導方法に
25 使用可能である。また、HLA-A2対立遺伝子（allele）は日本人の人口の約40%、北ヨーロッパ人の49%、南ヨーロッパ人の38%、アフリカ人の23%、中国人の53%（HLA 1991, Vol. 1: 1065~122

0, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992) で見られる。従って、これらのペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

5 (ペプチド)

本発明のペプチドは、配列表の配列番号 1 ~ 9 または配列番号 11 ~ 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。本発明のペプチドは、HLA-A24 拘束性または HLA-A2 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導または活性化することができる。

10 また、本発明のペプチドは配列表の配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであって、少なくとも HLA-A24 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化しうるペプチドでありうる。HLA-A24 拘束性細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化しうるペプチドの選択は、後述する実施例に記載の方法を用いて行うことができる。

15 さらに、本発明のペプチドは、HLA-24 拘束性 CTL と HLA-2 拘束性 CTL の両方を誘導および/または活性化できるペプチドであってもよい。

20 このように特定されたペプチドを元にして、少なくとも HLA-A2402 拘束性および/または HLA-A2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞による認識性の強さを指標とすることにより、1ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドも提供される。欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を導入する手段は自体公知であり、
25 例えばウルマーの技術 (Ulmer, L. M., Science, 219, 666, 1983) を利用することが出来る。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

また、lck 遺伝子のコードする蛋白質は、多型にもとづくと推定されるアミノ酸配列が若干異なるものがいくつか報告されている (Nature, 319:

682-685, 1986, Eur. J. Immunol., 16:1643-1646, 1986, J. Cell. Biochem., 38:117-126, 1988, Gene, 84:105-113, 1989)。本発明のペプチドは、このアミノ配列が異なる Lck 遺伝子産物由来のペプチドであって、HLA-A 24 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の CTL を誘導できるものも含まれる。

例えば、本発明のペプチドの 1 つである Lck 488-497 は配列表の配列番号 2 に記載するアミノ酸配列 DYLRSVLED F からなるが、Nature, 319:682-685, 1986 に報告されている Lck 蛋白質のアミノ酸配列に基づく 488-497 位のアミノ酸配列は DYLRSVLDD F であり、この配列も HLA-A 24 結合モチーフに含まれる。

本発明のペプチドは、HLA-A 24 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性 CTL を誘導および／または活性化しうる腫瘍抗原ペプチドであり、腫瘍特異的細胞傷害性 CTL を誘導および／または活性化するために使用できる。すなわち、本発明のペプチドは、癌ワクチンなどとして癌の特異的免疫治療に使用できるものである。

(ポリヌクレオチド)

本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、配列番号 1 ~ 9 および配列番号 11 ~ 17 に記載のペプチド、およびこれらペプチドのアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有し、かつ少なくとも HLA-A 2402 拘束性および／または HLA-A 2 拘束性の細胞傷害性 T 細胞による認識性を有するペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖である。さらに本発明のポリヌクレオチドには、これらポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも含まれる。ポリヌクレオチド分子として DNA 分子を代表例にとると、「DNA 分子にストリンジェントな条件下で

ハイブリダイズするDNA分子」は、例えば前述のMolecular Cloningに記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、 $6 \times SSC$ 、0.5% SDSおよび50% ホルムアミドの溶液中で42°Cにて加温した後、0.1×SSC、0.5% SDSの溶液中で68°Cにて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイズのシグナルが観察されることを表す。

本発明のポリヌクレオチドは、いずれも本発明のペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸としての試薬・標準品としても利用できる。

10

(形質転換体)

本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞、レトロウィルス等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなるペプチドの提供が可能である。本発明のペプチドは、単純蛋白質の状態で細胞傷害性T細胞による認識性が確認されており、蛋白質への糖付加の有無を無視できるため、遺伝子組換え技術による製造方法において宿主の選択は生産性のみを考慮すればよく容易にできる。

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系が利用できる。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せ利用できる。

形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現產生されるペプチドの生理活性、特に細胞傷害性T細胞による

認識性を指標にしておこなってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養によって生産される。

(化学合成)

- 5 本発明のペプチドは、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、ペプチド合成（丸善）1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。
- 10 (ペプチドの回収)
本発明のペプチドの回収は、細胞傷害性T細胞による認識性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差に基づく硫安、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、該ペプチドに対する抗体を作成し、ポリクローナル
15 抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

(抗体)

- 本発明のペプチドを免疫学的に認識する抗体は、自体公知の抗体作製法に従つて得ることができる。例えば、本発明のペプチドをアジュvantの存在下または
20 非存在下で単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、ヤギ、馬等が好適に用いられる。
- 25 ポリクローナル抗体は、本発明のペプチドで免疫された動物の血清から自体公知の抗体回収法、例えば好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

かくして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、本発明の
5 ベプチドの精製用抗体、試薬、標識マーカーなどとして利用できる。

(スクリーニング)

本発明のベプチド、該ベプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、
10 または本発明のベプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組合せることによって細胞傷害性T細胞を誘導または活性化しうる化合物のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物も対象とする。該化合物は、本発明のベプチドの
15 HLA-A2402拘束性および/またはHLA-A2拘束性のCTLによる認識性を増強する化合物、本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物、本発明のベプチドと同様に細胞傷害性T細胞を誘導もしくは活性化しうる化合物、また本発明のベプチドによるCTLの誘導もしくは活性化を増強する化合物などである。

20

(医薬組成物)

本発明のベプチド、該ベプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製したベクター、該ベクターにより形質転換させた細胞、本発明のベプチドを免疫学的に認識する抗体、本発明のスクリーニング方法によって得られる本発明のベプチドのHLA-A2402拘束性および/またはHLA-A2拘束性のCTLによる認識性を増強する化合物や本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化

合物などを、単独または複数組合せて利用することによって、これらの少なくとも1つを含んでなる医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は癌の治療において有用である。

例えば、本発明のペプチドを含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用される。このとき細胞性免疫の賦活のために、本発明のペプチドは適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、それ自体が人体に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。剤形は、自体公知のペプチド製剤の手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg～100mg／日／成人ヒト、好ましくは0.1mg～10mg／日／成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

または、患者の末梢血より单核球画分を採取し、本発明のペプチドとともに培養し、CTLが誘導された該单核球画分を患者の血液中に戻すことによっても、有効な癌ワクチン効果を得ることができる。培養するときの单核球濃度、ペプチドの濃度等の培養条件は、簡単な実験により決定することができる。また、培養時、インターロイキン2などのリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、癌の遺伝子治療のために有用である。これらDNAをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド含量として0.1μg～100mg／日／成人ヒト、好ましくは1μg～50mg／日／成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

(診断方法および診断用試薬キット)

本発明のペプチドは、該ペプチドの発現に関連した疾患（特に消化器系癌）の診断方法として有用であり、例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相應する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。すなわち、本発明のペプチドを診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。また本発明には、上記診断方法に使用する試薬キットも含まれる。

10 本発明の試薬キットは、少なくとも本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ペプチドを認識する抗体のうち1つ以上からなるものである。

実施例

15 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(lck 遺伝子の同定)

細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原を得るために、KE4腫瘍細胞のcDNAライブラリーから作製した合計 10^5 個のcDNAクローニングHLA-A2402と共にトランスフェクションしたVA13細胞を刺激細胞(stimulator)として用い、CTLとともに培養して、CTLを活性化せしめるcDNAクローニングを得た。CTLの活性化は、IFN-γの産生を指標にして測定した。この方法により、腫瘍拒絶抗原をコードする遺伝子の同定が可能である(J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998)。

具体的には、エフェクター細胞として用いたCTLは、HLA-A2402拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(KE4-CTL)である。この細胞は、食道

癌患者から樹立した (Int. J. Cancer, 81 : 457-466, 1999)。また、腫瘍抗原を得るために、KE4腫瘍細胞を用いてそのポリ(A)⁺RNAをcDNAに変換し、これをSal Iアダプターと結合して発現ベクター-pSV-SPORT-1 (GIBCO BRL) 中に挿入した。HLA-A2402または対照であるHLA-A0201のcDNAを、逆転写PCR (RT-PCR) によって得、そして、真核生物発現ベクターpCR3 (Invitrogen) 中にクローニングした。プラスミドDNAプールまたはKE4 cDNAライブラリーのクローニングの200ngと、HLA-A2402のcDNA200ngとを、OPTI-MEM (GIBCO BRL) 70μl中で、リボフェクチン1μlと、15分間混合した。

混合物の30μlを、ついで、 2×10^4 個のVA13細胞に添加し、5時間インキュベーションした。次に、10%のFCSを含むRPMI-1640培地200μlを加え、2日間培養した。その後、KE4-CTL (10^4 細胞/ウェル) を添加した。18時間インキュベーション後、上清の100μlを回収し、既に報告した (J. Exp. Med. 187 : 277~288, 1998) ように、ELISAキットを用いてIFN-γを測定した。

その結果、1つのクローニング (クローニング21) が、HLA-A24拘束性KE4-CTLを活性化することを見いだした (図1)。このcDNAクローニングの塩基配列は1,750塩基 (bp) 長であり、かつ509アミノ酸からなるLck蛋白質のアミノ酸配列のポジション31-506に対応する塩基配列であるポジション283-2,032と100%相同意を有することが判明した。すなわち、Lck遺伝子がコードする蛋白質は、HLA-A2402拘束性にCTLを活性化しうる腫瘍抗原であることが示唆された。

また、HLA-A2402拘束性KE-CTLの代わりに、大腸癌患者より樹立したCTL株 (OK-CTL) の亜株であるOK-CTL-e亜株 (HLA-A0207) (J. Immunol. 163 : 4999-5004, 1999) ならびに肺癌患者より樹立したCTL株 (GK-CTL) の2つの亜株であるG

K-CTL2-2-4亜株 (HLA-A0206) およびGK-CTL2-2-5亜株 (HLA-A0206) の合計3つのHLA-A2拘束性CTLをエフェクター細胞として用い、lck遺伝子とHLA-A0201、HLA-A0206、HLA-A0207、HLA-A2402、またはHLA-A2601とを
5 トランスフェクションしたVA13細胞を刺激細胞として用いて、Lck蛋白質がHLA-A24拘束性CTLのみならず、HLA-A2拘束性CTLをも活性化しうる腫瘍抗原であることを見いたした [図2の(A)、(B) および(C)]。

実施例2

10 (Lck蛋白質の発現)

種々の細胞および組織における蛋白質レベルでのLck (56kDおよび59kD) の発現を、抗Lckモノクローナル抗体を用いてウェスタンプロット分析により検討した。

原発性の結腸癌 ($n=49$)、非腫瘍性の結腸 ($n=5$)、肺癌 [腺癌: $n=15$ 8, 扁平上皮癌 (SCC): $n=8$]、食道癌細胞を検討に使用した。さらに、大腸癌細胞株 (COLO201, COLO205, COLO320, HCT116, およびSW620)、肺癌細胞株 (LK87: 腺癌細胞、およびLK79: 小細胞癌細胞)、食道癌細胞株 (KE4) も検討に用いた。

試料は、10mMのTris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、
20 0.5% Triton X-100、0.2mM PMSF (Sigma Chemical Co.) と0.03トリプシンインヒビター単位/mlのアプロチニンからなる緩衝液で溶解し、超音波処理し、そして14,000rpmで20分間遠心した。得られた上清を、細胞質 (cytosol) 画分として使用した。溶解物は、10% SDS-PAGEで分離した。

25 アクリルアミドゲル中で得られた蛋白質は、Hybond™-ポリビニリジンジフルオライド膜 (Amersham) に転写 (blot) し、抗Lckモノクローナル抗体 (Santa Cruz) と室温で4時間インキュベーションした。

他の方法は、既報告（Int. J. Cancer, 54: 158-165, 1995）のウエスタンプロット分析に従った。

Lck蛋白質は未刺激の末梢血単核球（PBMC）では認められなかったが、
10 μg/mlのフィトヘマグルチニン（phytohemagglutinin；PHA）で48時間刺激した後の活性化されたPBMC（PHA-blas
t）の細胞質（cytosol）画分には検出されるようになった。Lck蛋白質はSCCまたは腺腫瘍細胞株などの試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食
道癌、肺SCCおよび肺腺癌細胞などの多種の臓器から得られた新鮮腫瘍組織の
大多数で検出された。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなか
10 った（表1）。

表 1

細胞の種類／由来	Lck蛋白質の発現	
	細胞株	組織
正常細胞		
末梢血単核球	2/2	-
PHA-blast	2/2	-
COS-7/VA13	0/2	-
非癌部大腸組織	-	4/6
非癌部食道組織	-	4/6
非癌部子宮組織	-	4/6
癌細胞		
大腸癌	7/7	38/49
食道癌	6/14	5/9
肺癌	4/17	4/10
胃癌	2/8	ND
子宮癌	5/7	55/64
卵巣癌	0/12	ND
肝細胞癌	0/13	ND
骨肉腫	0/16	ND
原発性脳腫瘍	0/16	5/24
転移性脳腫瘍	-	6/6

ND : 未確定

実施例 3

5 (HLA-A24拘束性CTLにより認識される腫瘍抗原ペプチド)

HLA-A24分子結合性のLck由来の腫瘍抗原ペプチドを特定するために、13個の異なったペプチドを合成してC1R/A2402に導入し、KE4-CTLによるIFN- γ 産生を増強する能力について試験した。

HLA-A2402分子への結合能をもつLck由来ペプチドは、HLA-A24結合モチーフ(motif)に対するペプチドについて文献検索し、13種

の異なるペプチドを、lck 遺伝子産物の 509 アミノ酸配列 (Nature, 319: 682~685, 1986) に基づいて合成した。但し、一部アミノ酸に変更を加えたものもある。合成したペプチドを表 2 に示す。

5 表 2

Lckペプチド	アミノ酸配列										
39-48	:	R	N	G	S	E	Y	R	D	P	L
71-80	:	S	Y	E	P	S	H	D	G	D	L
114-122	:	N	F	V	A	K	A	N	S	L	
162-170	:	S	F	S	L	S	V	R	D	F	
191-199	:	F	Y	I	S	P	R	I	T	F	
208-216	:	H	Y	T	N	A	S	D	G	L	
303-312	:	L	Y	A	V	V	T	Q	E	P	I
317-325	:	E	Y	M	E	N	G	S	L	V	
353-361	:	A	F	I	E	E	R	N	Y	I	
393-402	:	E	Y	T	A	R	E	G	A	K	F
445-453	:	T	N	P	E	V	I	Q	N	L	
486-494	:	T	F	D	Y	L	R	S	V	L	
488-497	:	D	Y	L	R	S	V	L	E	D	F

腫瘍抗原ペプチドの特定のために、H L A - A 2 4 0 2でトランスフェクションしたC 1 R / A 2 4 0 2細胞の 2×10^4 個を、終濃度 $10 \mu\text{M}$ のペプチドと2時間パルスした。ついで、 1×10^4 個のK E 4 - C T Lを加え、18時間インキュベーションした。上清の $100 \mu\text{l}$ を回収し、E L I S Aによって、I F N - γ を測定した。

合成した13個のペプチドのうち、6個のペプチド〔L c k 7 1 - 8 0、L c k 2 0 8 - 2 1 6（配列番号3）、L c k 3 1 7 - 3 2 5、L c k 3 5 3 - 3 6 1、L c k 4 8 6 - 4 9 4（配列番号1）、L c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）〕が、C T LにおけるI F N - γ 産生増強活性を有しており（図3）、特に3個のペプチド〔L c k 2 0 8 - 2 1 6（配列番号3）、L c k 4 8 6 - 4 9 4（配列番号1）、L c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）〕で強い活性が認められた。L c k 4 8 6 - 4 9 4（配列番号1）、またはL c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）ペプチドの、C T LによるI F N - γ 産生を増強する活性は濃度依存的であり、 1nM 程度で認められた。一方、L c k 2 0 8 - 2 1 6（配列番号3）の活性は 100nM 以上で認められた（図4）。

C 1 R / A 2 4 0 2細胞の代わりにV A 1 3細胞（ 2×10^4 個）を用い、H L A - A 2 4 0 2でトランスフェクションしてこれらのペプチドをパルスし、刺激細胞（s t i m u l a t o r）として使用した場合も、同様の結果が得られた。

また、上記のC T L活性化試験において、抗C D 3（N u T 3）、抗C D 4（N U T h / s）、抗C D 8（N u T C / i）、抗C D 1 3（M C S - 2）、抗M H CクラスI（W 6 / 3 2）または抗M H CクラスII（H D R 1）抗体（I n t . J . C a n c e r , 5 8 : 3 1 7 ~ 3 2 3 , 1 9 9 4 ）を用いたところ、3つの各ペプチドでパルスしたC 1 R / A 2 4 0 2細胞に対する反応におけるK E 4 - C T LによるI F N - γ 産生は、抗C D 3、抗C D 8および抗M H CクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗C D 4、抗M H CクラスIIおよび抗C D 1 3モノクローナル抗体では阻害されなかった〔図5の（A）、（B）および（C）〕。従って、K E 4 - C T Lは、C D 3 $^+$ C D 8 $^+$ C D 4 $^-$ 表現型を有し、

MHCクラスIを認識する細胞傷害性T細胞であることが確認された。

さらに、CTLにおけるペプチドの特異性を確認するために、KE4-CTLの亜株(subline)を、親株であるHLA-A2402拘束性KE4-CTLから、限界希釈培養(limiting dilution culture)によって、樹立した(J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998)。得られたCD3⁺CD8⁺CD4⁻表現型を有する20の異なったKE4-CTLの細胞亜株(subline)について、上記3個の各ペプチドに対する反応性について試験した。

その結果、2つの亜株(亜株 #49および#93)がLck488-497(配列番号2)を、1つのクローン(クローン #80)がLck486-494(配列番号1)を認識した〔図6の(B)、(C)および(D)〕。亜株 #19はLck208-216(配列番号3)およびLck486-494(配列番号1)の両方と反応した〔図6の(A)〕。他の16の亜株はこれらのペプチドのいずれとも反応しなかった。このことから、CTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であることが示唆される。

実施例4

(ペプチドによるHLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

3個のペプチド〔(Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2)〕について、大腸癌患者から得たPBMCから、Lck蛋白質を発現している腫瘍細胞株(KE4、SW620およびCOLO201)に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を試験した。

HLA-A24⁺患者または健常人のPBMCの2×10⁶個を、培養培地(4.5% RPMI-1640培地、4.5% AIM-V[®]培地/GIBCO BRL、およびIL-2の100U/mlと0.1mMのMEMノンエッセンシャルアミノ酸溶液/GIBCO BRLを含む10% FCS)2mlを含む24ウエルプレート

レートの各ウエル中で、ペプチド $10 \mu\text{M}$ とインキュベーションした。

培養 7 日目および 14 日目にこの細胞を回収して洗浄し、放射線照射（50 グレイ）した自己 PBMC または樹状細胞をペプチドでパルスしたものを抗原提示細胞（APC）として用いて刺激した。この樹状細胞は、10% FCS と 100 U/ml の IL-4 と 100 U/ml の GM-CSF（顆粒球・マクロファージ-コロニー刺激因子）を含む RPMI 1640 (GIBCO BRL) 中で、PBMC (2×10^6 細胞/ウエル) を 7 日間インキュベーションすることにより誘導した。

培養 21 日目に採取した細胞をエフェクターとし、直ちに種々のターゲット（標的細胞）に対する反応性を、IFN- γ の産生能を指標として ELISA 法により測定した。その結果を図 7 に示す。Lck 208-216（配列番号 3）、Lck 486-494（配列番号 1）、Lck 488-497（配列番号 2）を用いて *in vitro* で 3 回刺激した PBMC、特に Lck 486-494（配列番号 1）、Lck 488-497（配列番号 2）で刺激した PBMC は、HLA-A-A24 $^-$ 腫瘍細胞 (COLO 201) に対する反応より、HLA-A24 $^+$ 腫瘍細胞 (KE 4 および SW 620) に対する反応において、より多くの IFN- γ を産生した。一方、健常人から得た PBMC は、抗原提示細胞（APC）として放射線照射した PBMC を用いてパルスした 3 個のペプチドのいずれを用いて刺激しても、HLA-A24 拘束性の CTL 活性は示さなかった。健常人から得られた PBMC はペプチドをパルスした樹状細胞 (Dendritic Cell; DC) を APC として用いて刺激したときには HLA-A24 拘束性の CTL 活性を示した（表 3）。

表 3

ドナー	抗原提示細胞	ペプチド	癌細胞株の認識による インターフェロン- γ 産生量 (pg/ml)		
			KE4	SW620	COL0201
			(A24 $^+$)	(A24 $^+$)	(A24 $^-$)
大腸癌患者	自己末梢血単核	なし	1079	902	194
		Lck208-216	1479	1113	188
		Lck486-494	1857	1724	289
		Lck488-497	2527	2140	424
健常ドナー 1	自己樹状細胞	なし	230	380	54
		Lck208-216	570	786	124
		Lck486-494	1105	2061	177
		Lck488-497	621	966	122
健常ドナー 2	自己末梢血単核	なし	101	187	0
		Lck208-216	82	128	1
		Lck486-494	41	94	10
		Lck488-497	90	140	6

また、標的細胞からの ^{51}Cr 遊離試験のために、ペプチドを用いて3回刺激した上記PBM Cを、相当するペプチドで予めパルス処理した放射線処理HLA-A24 $^+$ 異種PBM C (2×10^5 細胞/ウェル) からなるフィーダー細胞と共にさらに培養した。再培養の約24日目に、これら細胞の細胞傷害性T細胞活性をIFN- γ 産生量の測定により確認し、さらにこれら細胞について6時間の ^{51}Cr 遊離試験をエフェクター/ターゲット(標的細胞)の比率を変えて行い、細胞傷害性を直接的に検討した。上記3つのLck由来のペプチドで刺激したPBM Cは、HLA-A24 $^+$ KE腫瘍細胞およびSW620腫瘍細胞を溶解したが、健常人からのHLA-A24 $^+$ PHA活性化T細胞またはHLA-A24 $^-$ CO

L0201腫瘍細胞を溶解しなかった。Lck488-497を用いた結果を図8の(A)に、Lck208-216を用いた結果を図8の(B)に示す。従って、Lck由来のペプチドはHLA-A24拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導しうることが明らかとなった。

5

実施例5

(癌患者から得た末梢血単核球におけるHLA-A24拘束性CTLの誘導)

3個のペプチド〔Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2)〕について、癌患者から得たPBMCから、Lck蛋白質を発現した腫瘍細胞株(KE4、SW620およびCOLO201)に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を、IFN- γ 産生量を指標に測定した。CTLの誘導方法、およびIFN- γ 測定方法は実施例4と同様の方法を用いた。

その結果、表4に示すように、大腸癌患者および食道癌患者のPBMCから、Lck208-216(配列番号3)、Lck488-497(配列番号2)によりCTLが誘導された。

表4

症例	年齢	性別	癌種	転移の有無	LckペプチドによるCTL誘導			
					ペプチド	Lck208-216	Lck486-494	Lck488-497
N.I.	51	男性	大腸癌	+	(-)	-	+	-
Y.K.	73	女性	食道癌	+	試験せず	+	-	+

次に、該大腸癌患者のPBMC(2×10^6 個)を予め、3個のペプチド、Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2)を加えて刺激し、その後、抗原提示細胞とし

て各ペプチドを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えてインキュベーションした HLA-A24⁺ C1R/A2402細胞に加えてさらに培養し、培養上清中に產生された IFN- γ 量を測定した。図9の(A)、(B)、(C)および(D)に示すように、予め、Lck486-494(配列番号1)またはLck488-497(配列番号2)で刺激した大腸癌患者のPBM Cは、抗原提示細胞に提示されたペプチド、それぞれLck486-494(配列番号1)またはLck488-497(配列番号2)にのみ反応して IFN- γ 产生、すなわち CTLを誘導した。つまり、Lck486-494(配列番号1)またはLck488-497(配列番号2)は大腸癌患者のPBM Cから、予備刺激することによりペプチド特異的なCTLを誘導しうることが判明した。一方、Lck208-216(配列番号3)またはペプチド非存在下で大腸癌患者のPBM Cを予め刺激した場合は、ペプチド特異的なCTLは誘導できなかった。

次に、該大腸癌患者から誘導されたCTLの性状を検討するために、標的細胞としてSW620細胞を用い、抗CD4(NUTh/s)、抗CD8(NuTC/i)、抗CD14、抗MHCクラスI(W6/32)または抗MHCクラスII(HDR1)抗体をそれぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Lck488-497(配列番号2)を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、さらに上記大腸癌患者から誘導されたCTLを加えて、インキュベーションし、上清中に產生される IFN- γ 量を測定した(図10)。その結果、CTLからの IFN- γ 产生は抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害された。すなわち、大腸癌患者から誘導されたCTLは、CD8⁺CD4⁻表現型を有しMHCクラスIを認識する細胞傷害性T細胞であることが確認された。

上記大腸癌患者のPBM C中のCTL前駆細胞について検討を行った。96ウエルプレートにSW620細胞を播いてインキュベーションし、予めLck488-497(配列番号2)で刺激した上記大腸癌患者のCTLを1個~100個/ウエルとなるよう加えてさらに培養し、標的細胞であるSW620細胞の生存するウエルを確認した。対照として、ペプチドで刺激しない上記大腸癌患者のC

T Lを用いた。結果は図 1 1に示す。大腸癌患者のP B M C中のC T L前駆細胞の頻度は、ペプチドで刺激しないときは1／634であるが、L c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）で刺激すると1／81となる。すなわち、ペプチドで刺激することにより、C T L前駆細胞が増加することが認められた。

5

実施例 6

（H L A - A 2 4拘束性C T L誘導性を有するペプチドの検討）

以上のように、L c k由来の3個のペプチドL c k 2 0 8 - 2 1 6（配列番号3）（H Y T N A S D G L）L c k 4 8 6 - 4 9 4（配列番号1）（T F D Y L R S V L）およびL c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）（D Y L R S V L E D F）がH L A - A 2 4⁺腫瘍細胞株を認識するC T Lを誘導することができることを見いだした。これらの結果から、2個のペプチドL c k 4 8 6 - 4 9 4（配列番号1）およびL c k 4 8 8 - 4 9 7（配列番号2）の重なる領域である一定のアミノ酸D Y L R S Vを、ペプチドで誘導されたC T Lが腫瘍抗原エピトープとして認識すること、およびL c k蛋白質においてキナーゼドメインに含まれるこの部位が腫瘍拒絶に対する意義を有することが示唆される。このアミノ酸配列D Y L R S Vに着目し、この配列に相同性をもつペプチドを検索したところ、表5に示す様に、L c kと同じS r c ファミリーに属するチロシンキナーゼ（A n n. R e v. B i o c h e m. 5 4 : 8 9 7 - 9 3 0, 1 9 8 5）に、相同性を有するアミノ酸配列をもつものがあることが判明した。

表5

		488-497
<u>Lck</u>	<u>486-498</u>	: T F D Y L R S V L E D F F
		486-494
<u>Src</u>	<u>511-523</u>	: T F E Y L Q A F L E D Y F
<u>Yes</u>	<u>508-520</u>	: T F E Y I Q S F L E D Y F
<u>Fgr</u>	<u>504-516</u>	: T F E Y L Q S F L E D F F
<u>Fyn</u>	<u>512-524</u>	: T F E Y L Q S F L E D Y F
<u>Lyn</u>	<u>489-501</u>	: T F D Y L Q S V L D D F Y
<u>Hck</u>	<u>503-515</u>	: T F E Y I Q S V L D D F Y
<u>Blk</u>	<u>482-494</u>	: T F E F L Q S V L E D F Y

これら S r c ファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて、S r c 5
 1 1 - 5 1 9 (配列番号 4 : T F E Y L Q A F L) 、 Y e s 5 0 8 - 5 1 6 (配
 5 列番号 5 : T F E Y I Q S F L) 、 F y n 5 1 2 - 5 2 0 (配列番号 6 : T F E
 Y L Q S F L) 、 L y n 4 8 9 - 4 9 7 (配列番号 7 : T F D Y L Q S V L) 、
 H c k 5 0 3 - 5 1 1 (配列番号 8 : T F E Y I Q S V L) 、 B l k 4 8 2 - 4
 9 0 (配列番号 9 : T F E F L Q S V L) を合成し、各 10 μg / ml を標的細
 胞としての SW 6 2 0 細胞とともにインキュベーションし、さらに実施例 1 およ
 10 び実施例 2 で用いた K E 4 - C T L 細胞を加えて培養し、培養上清中に產生され
 た I F N - γ 量を指標として C T L 誘導活性を調べた。また、陽性コントロール
 として標的細胞に K E 4 を使用した。その他の方法は実施例 4 と同様の方法を用

いた。図12に示すように、各Srcファミリー由来のペプチドは、Lck由来のペプチドと同様、あるいはそれ以上のCTL誘導能を示した。

実施例7

5 (癌患者におけるSrcファミリー由来のペプチドによるCTLの誘導)

Lck 486-494 (配列番号1: TFDYLRSQL)、Src 511-

519 (配列番号4: TFEYLQAF)、Yes 508-516 (配列番号

5: TFEYIQSFL)、Fyn 512-520 (配列番号6: TFEYLQ

SFL)、Lyn 489-497 (配列番号7: TFDYQLQSVL)、Hck

10 503-511 (配列番号8: TFEYIQSVL)、Btk 482-490 (配

列番号9: TFEFLQSVL)について、転移性癌患者より得たPBMCから

HLA-A24拘束性CTLを誘導しうるか検討した。CTLの誘導方法および

CTLの活性測定法は実施例4と同様の方法により行い、標的細胞としては、K

E4細胞 (HLA-A2402/26)、SW620細胞 (HLA-A0201

15 /24)、COLO201細胞 (HLA-A0101/0201)、VA13細

胞 (HLA-A02) を用いた。Lck 486-494 (配列番号1) は癌患者

7例中4例、Src 511-519 (配列番号4) は3例中2例、Yes 508

-516 (配列番号5) は3例中1例、Fyn 512-520 (配列番号6) は

2例中1例、Hck 503-511 (配列番号8) は2例中2例、Btk 482

20 -490 (配列番号9) は2例中1例において、PBMC中にCTLを誘導した。

しかし、Lyn 489-497 は検討した2例いずれにおいてもCTLは誘導し

なかった。

実施例8

25 (HLA-A2拘束性CTLにより認識される腫瘍抗原ペプチド)

HLA-A2分子結合性のLck由来の腫瘍抗原ペプチドを特定するために、

24個の異なったペプチドを合成してVA13 (HLA-A02) に導入し、O

K - C T L または G K - C T L 亜株 (2 - 2 - 4) による I F N - γ 産生を増強する能力について実施例 3 と同様の方法で試験した。

H L A - A 2 分子への結合能をもつ L c k 由来ペプチドは、 H L A - A 2 結合モチーフ (m o t i f) に対するペプチドについて文献検索し、 24 種の異なる
5 ペプチドを、 l c k 遺伝子産物の 509 アミノ酸配列 (N a t u r e, 319 :
682 ~ 685, 1986) に基づいて合成した。合成したペプチドを表 6 および表 7 に示す。

10

15

20

25

表6

Lck由来ペプチドのHLA-A0201結合モチーフ

340-348	:	K	L	L	D	M	A	A	Q	I	
185-193	:	N	L	D	N	G	G	F	Y	I	
36-44	:	L	L	I	R	N	G	S	E	V	
387-395	:	R	L	I	E	D	N	E	Y	T	
347-355	:	Q	I	A	E	G	M	A	F	I	
492-500	:	S	V	L	E	D	F	F	T	A	
299-307	:	R	L	V	R	L	Y	A	V	V	
493-501	:	V	L	E	D	F	F	T	A	T	
246-254	:	K	L	V	E	R	L	G	A	A	
279-287	:	S	M	S	P	D	A	F	L	A	
293-301	:	K	Q	L	Q	H	Q	R	L	V	
151-159	:	F	L	I	R	E	S	E	S	T	
35-44	:	R	L	L	I	R	N	G	S	E	V
201-210	:	G	L	H	E	L	V	R	H	Y	T
231-240	:	K	P	W	W	E	D	E	W	E	V
379-388	:	K	I	A	D	F	G	L	A	R	L
294-303	:	Q	L	Q	H	Q	R	L	V	R	L
335-344	:	K	L	T	T	N	K	L	L	D	M
110-119	:	F	I	P	F	N	F	V	A	K	A
250-259	:	R	L	G	A	A	Q	F	G	E	V

表 7

Lck由来ペプチドのHLA-A0206結合モチーフ

61-69	:	L	Q	D	N	L	V	I	A	L
239-247	:	E	V	P	R	E	T	L	K	L
422-430	:	D	V	W	S	F	G	I	L	L
27-36	:	I	V	R	L	D	G	K	D	R

5 腫瘍抗原ペプチドの特定のために、HLA-A2でトランスフェクションしたVA13細胞の 2×10^4 個を、終濃度 $10 \mu\text{M}$ のペプチドと2時間パルスした。ついで、 1×10^4 個のKE4-CTLを加え、18時間インキュベーションした。上清の $100 \mu\text{l}$ を回収し、ELISAによって、IFN- γ を測定した。

これらのペプチドのうち、7個のペプチド[Lck61-69(配列番号11)、10 Lck246-254(配列番号12)、Lck294-303(配列番号13)、Lck340-348(配列番号14)、Lck347-355(配列番号15)、Lck422-430(配列番号16)、Lck492-500(配列番号17)]がOK-CTL亜株およびGK-CTL亜株(2-2-4)のIFN- γ 産生を増強した〔図13の(A)および(B)〕。また、パルスするペプチドの濃度を15 变化させて同様の実験を行ったところ、Lck61-69(配列番号11)は特にOK-CTL亜株を、Lck246-254(配列番号12)は特にGK-CTL亜株(2-2-4)を、またLck422-430(配列番号16)は特にGK-CTL亜株(2-2-5)を、濃度依存的に活性化し、これらCTLからのIFN- γ 産生を増強した〔図14の(A)、(B)、および(C)〕。

実施例 9

(ペプチドによるHLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞の誘導)

3個のペプチド〔(Lck61-69(配列番号11)、Lck246-25
4(配列番号12)、Lck422-430(配列番号16)〕について、転移
を有する大腸癌患者から得たPBM Cから、腫瘍細胞株Panc-1、SW62
0、COLO320およびVA13に対するHLA-A2拘束性CTLを誘導す
る活性について試験した。

転移を有するHLA-A2⁺大腸癌患者のPBM Cを用い、実施例4と同様の
方法でCTLの誘導およびIFN-γの測定を行った〔図15の(A)および(C)〕。
またCTLの細胞傷害活性を⁵¹Cr遊離試験により直接的に測定した〔図15の
(B)および(D)〕。Lck246-254(配列番号12)およびLck4
1022-430(配列番号16)は、転移を有するHLA-A2⁺大腸癌患者から
のPBM Cから、HLA-A2拘束性腫瘍特異的CTLを誘導した。

実施例10

(癌患者におけるHLA-A2拘束性CTLの誘導)

15 3個のペプチド〔(Lck61-69(配列番号11)、Lck246-25
4(配列番号12)、Lck422-430(配列番号16)〕について、種々
の癌患者から得たPBM Cから、HLA-A2拘束性CTLを誘導しうるか検討
した。CTLの誘導方法およびCTLの活性測定法は実施例4と同様の方法によ
り行い、標的細胞としては、SW620細胞(HLA-A0201/24)を用
20 いた。Lck246-254(配列番号12)は癌患者6例中2例、Lck42
2-430(配列番号16)は6例中3例において、PBM C中にCTLを誘導
した(表8)。

表 8

症例	年齢	性別	癌種	ステージ	転移	LckペプチドによるCTL誘導			
						ペプチドなし	Lck246-254	Lck61-69	Lck422-430
1	53	女性	大腸癌	IV	+	-	+	-	-
2	72	女性	大腸癌	IV	+	-	+	-	+
3	57	女性	大腸癌	IIIa	+	-	-	-	-
4	76	男性	肺癌	III	+	-	-	-	+
5	50	男性	食道癌	IV	+	-	-	-	+
6	73	男性	胃癌	I	-	-	-	-	-

産業上の利用の可能性

本発明のLck由来のペプチドおよびSrcファミリー由来のペプチドは、腫瘍抗原ペプチドであり、癌患者のPBM CからHLA-A24拘束性および／またはHLA-A2拘束性の腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができる。

- 5 Lck蛋白質は大腸、肺および食道を含む大多数の癌組織で発現している。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドは、癌を対象とする特異的免疫治療に用いることができる。また、HLA-A24対立遺伝子(allele)は、日本人の人口の約60%（多くはその95%の遺伝型がA2402である）、コーカサス人の20%、アフリカ人の12%でみられる。HLA-A2対立遺伝子は、日本人の約40%、中国人の53%、北コーカサス人の49%、南コーカサス人の38%、黒人アフリカ人の23%においてみられる。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドを使用する特異的免疫療法は、多数の癌患者に適用しうる。本発明により提供されるペプチド、これをコードするポリヌクレオチド、これを認識する抗体は、癌の治療および診断の分野で、極めて有用な手段を提供するものである。

配列表フリー テキスト

配列番号 10 :

<220>

- 5 <230> Srcファミリーチロシンキナーゼのアミノ酸配列に基づいて作製した、
HLA-24拘束性細胞傷害性T細胞を誘導する能力を有するペプチド。

<222> (3)

<230> Xaaは、AspまたはGluでありうる。

<222> (4)

- 10 <230> Xaaは、TyrまたはPheでありうる。

<222> (5)

<230> Xaaは、LeuまたはIleでありうる。

<222> (6)

<230> Xaaは、ArgまたはGlnでありうる。

- 15 <222> (7)

<230> Xaaは、SerまたはAlaでありうる。

<222> (8)

<230> Xaaは、ValまたはPheでありうる。

<222> (10)

- 20 <230> Xaaは、GluまたはAspでありうる。

<222> (12)

<230> Xaaは、PheまたはTyrでありうる。

<222> (13)

<230> Xaaは、PheまたはTyrでありうる。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、
配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 11、配列番
5 号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、また
は配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。
2. 下記の式で表される配列表の配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるペ
プチド；

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii

10 ここで、Xaaは、AspまたはGlu、
Xbbは、TyrまたはPhe、
Xccは、LeuまたはIle、
Xddは、ArgまたはGln、
Xeeは、SerまたはAla、
15 Xffは、ValまたはPhe、
Xggは、GluまたはAsp、
Xhhは、PheまたはTyr、
Xiiは、PheまたはTyrである。

3. 少なくとも請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドからなる細胞傷
害性 T 細胞の誘導剤。
20
4. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドを用いることを特徴とする
細胞傷害性 T 細胞の誘導方法。
5. 少なくとも請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドからなる癌ワク
チン。
- 25 6. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオ
チドまたはその相補鎖。
7. 請求の範囲第 6 項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジ

エントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

8. 請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

9. 請求の範囲第8項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

5 10. 請求の範囲第9項に記載の形質転換体を培養する工程を含むペプチドの製造方法。

11. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

12. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性および/またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および/または請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第8項に記載の組換えベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、または請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

13. 請求の範囲第12項に記載のスクリーニング方法で得られた化合物。

14. 請求の範囲第1項もしくは第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項もしくは第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第8項に記載の組換えベクター、請求の範囲第9項に記載の形質転換体、請求の範囲第11項に記載の抗体、または請求の範囲第13項に記載の化合物のうちの少なくとも1つを癌治療有効量を含んでなる、癌治療に用いる医薬組成物。

15. 請求の範囲第3項に記載の細胞傷害性T細胞の誘導剤、請求の範囲第5項に記載の癌ワクチン、または請求の範囲第14項に記載の医薬組成物を癌疾患に用いることを特徴とする治療方法。

16. 請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチドの発現または活性に関連

した疾病的診断方法であって、(a) 該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および／または(b) 個体由来の試料中の該ペプチドをマークーとして分析することを含む方法。

17. 請求の範囲第16項に記載の方法に使用する試薬キットであって、少なくとも請求の範囲第1項または第2項に記載のペプチド、請求の範囲第6項または第7項に記載のポリヌクレオチド、請求の範囲第11項に記載の抗体のうちの1つ以上からなる試薬キット。

図 1

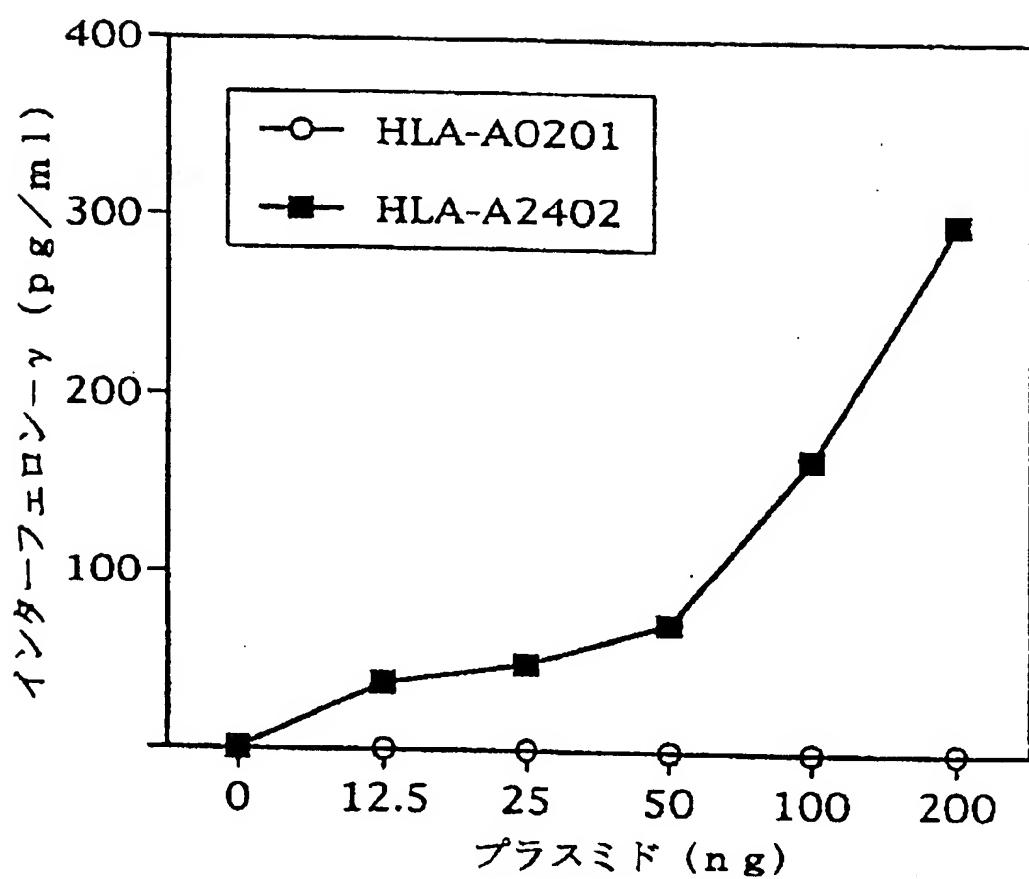


図 2

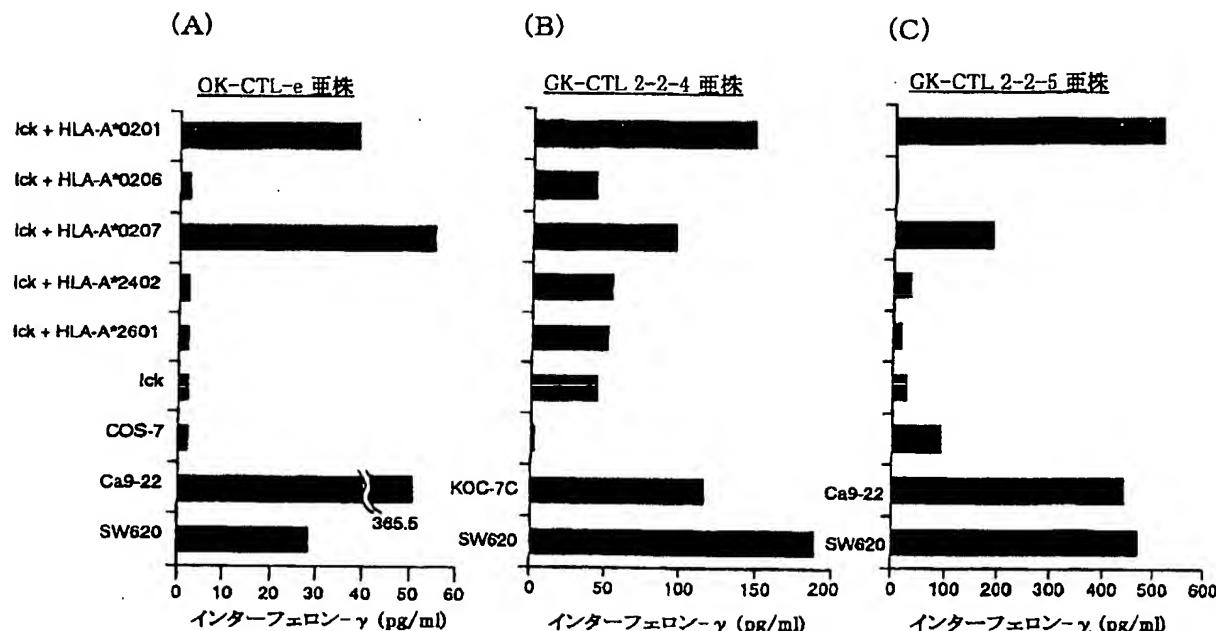


図 3

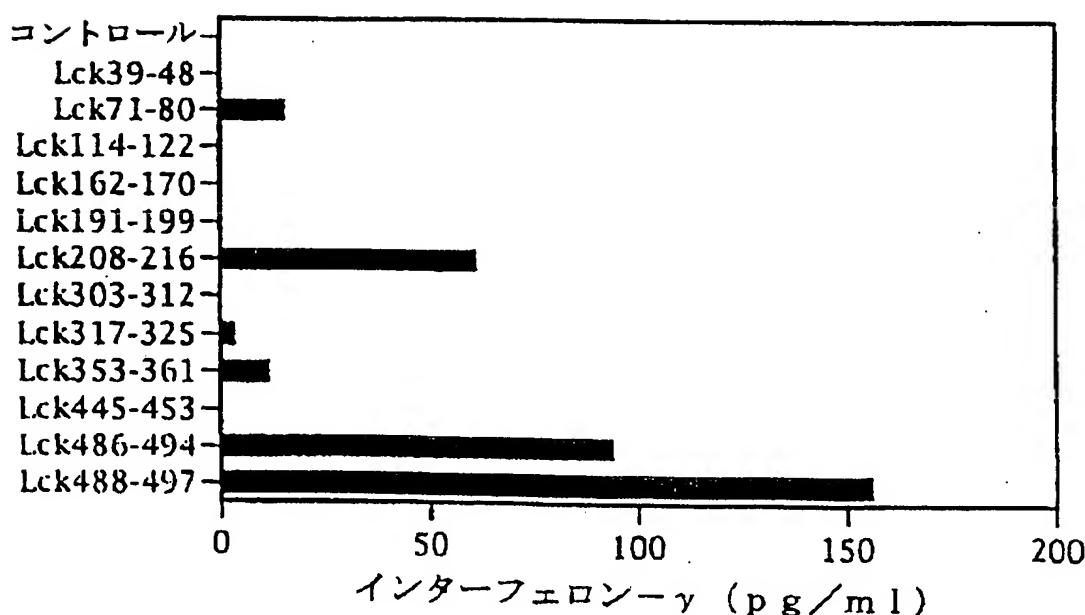


図4

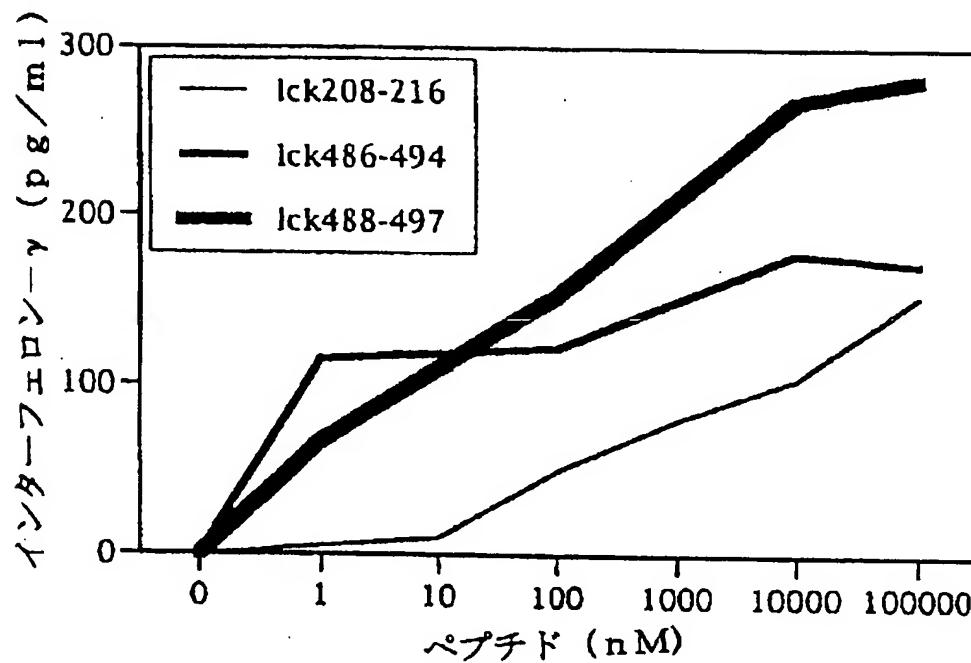


図5

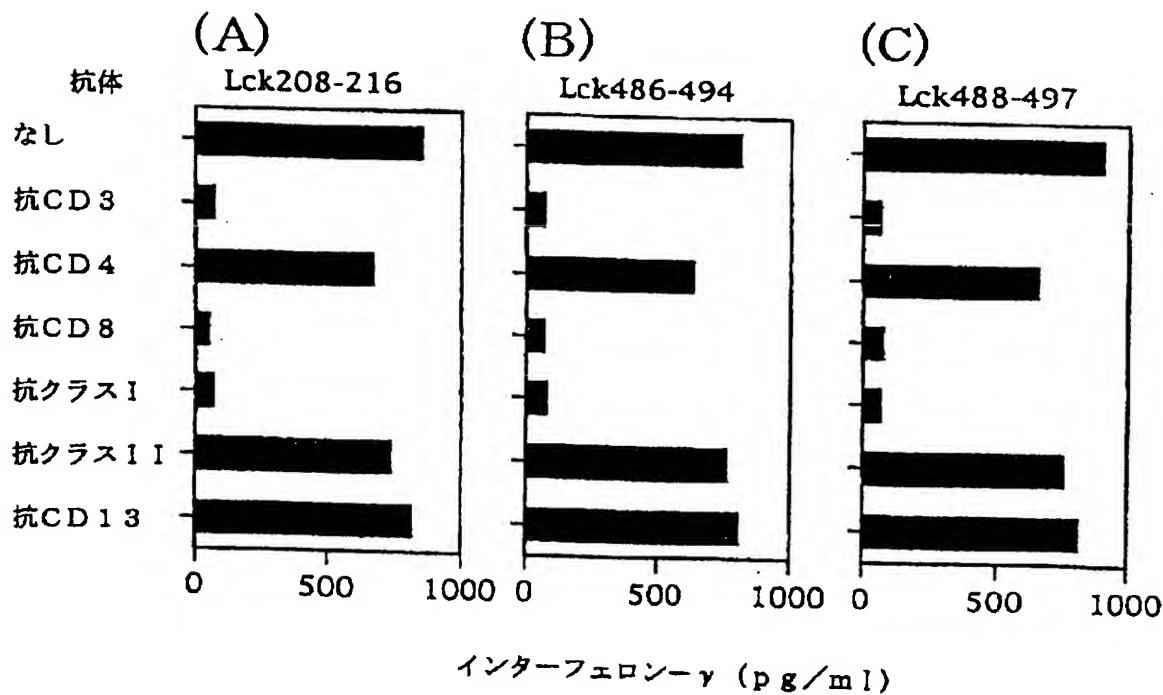


図 6

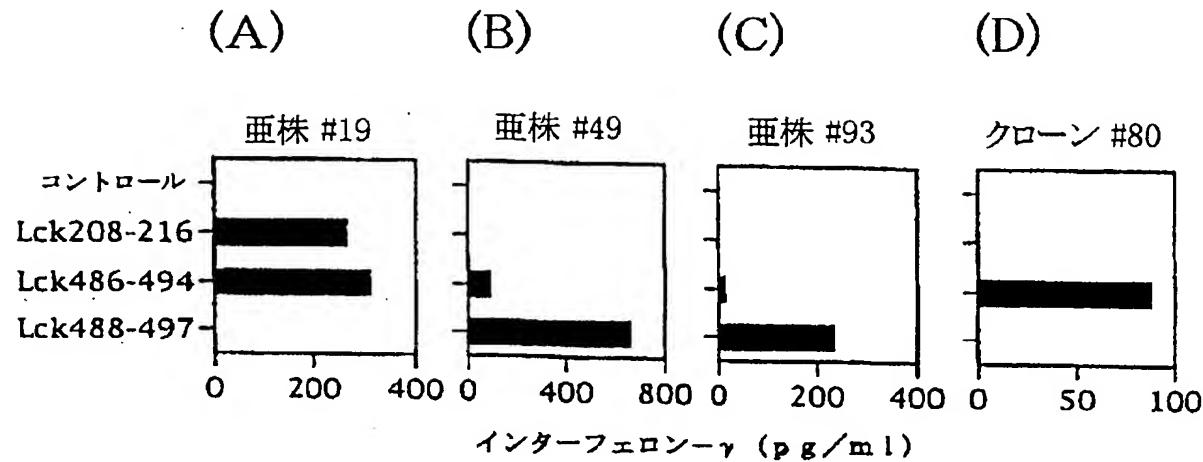


図 7

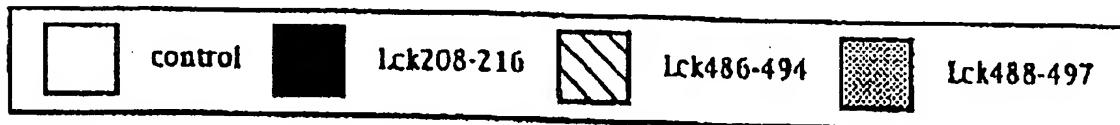
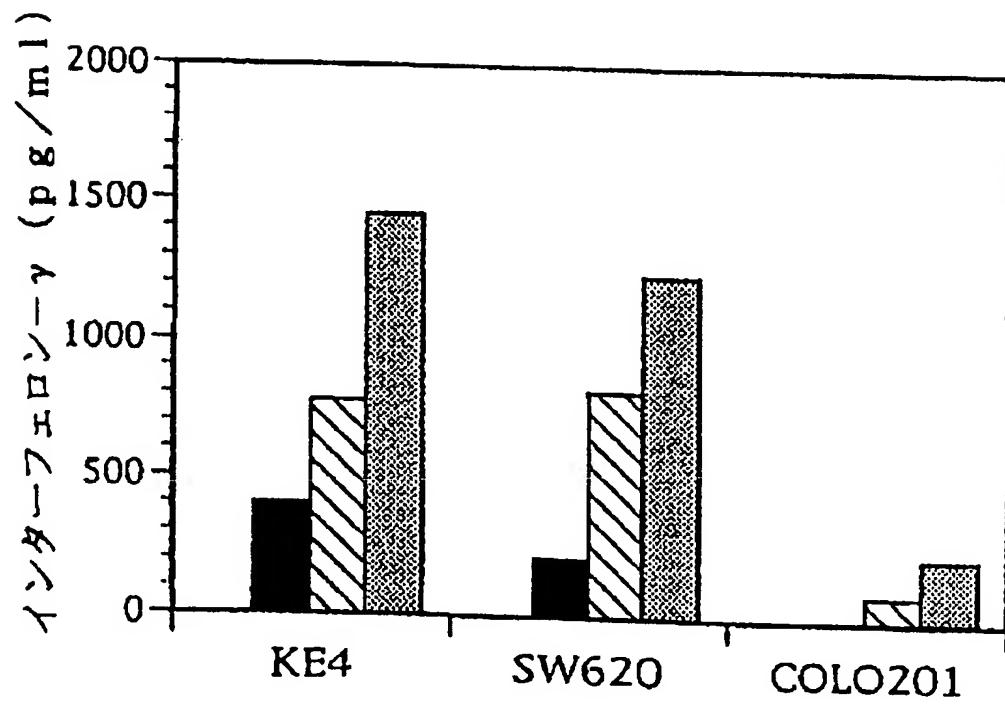
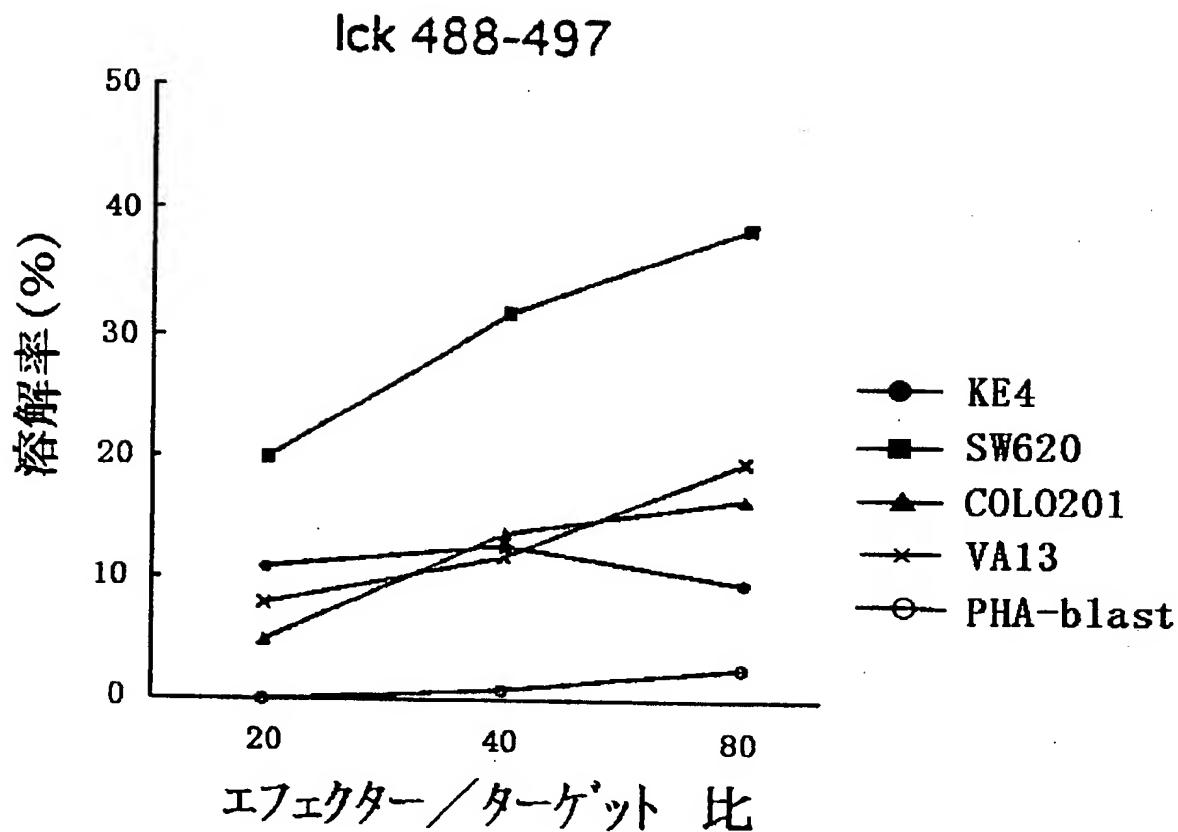


図 8

(A)



(B)

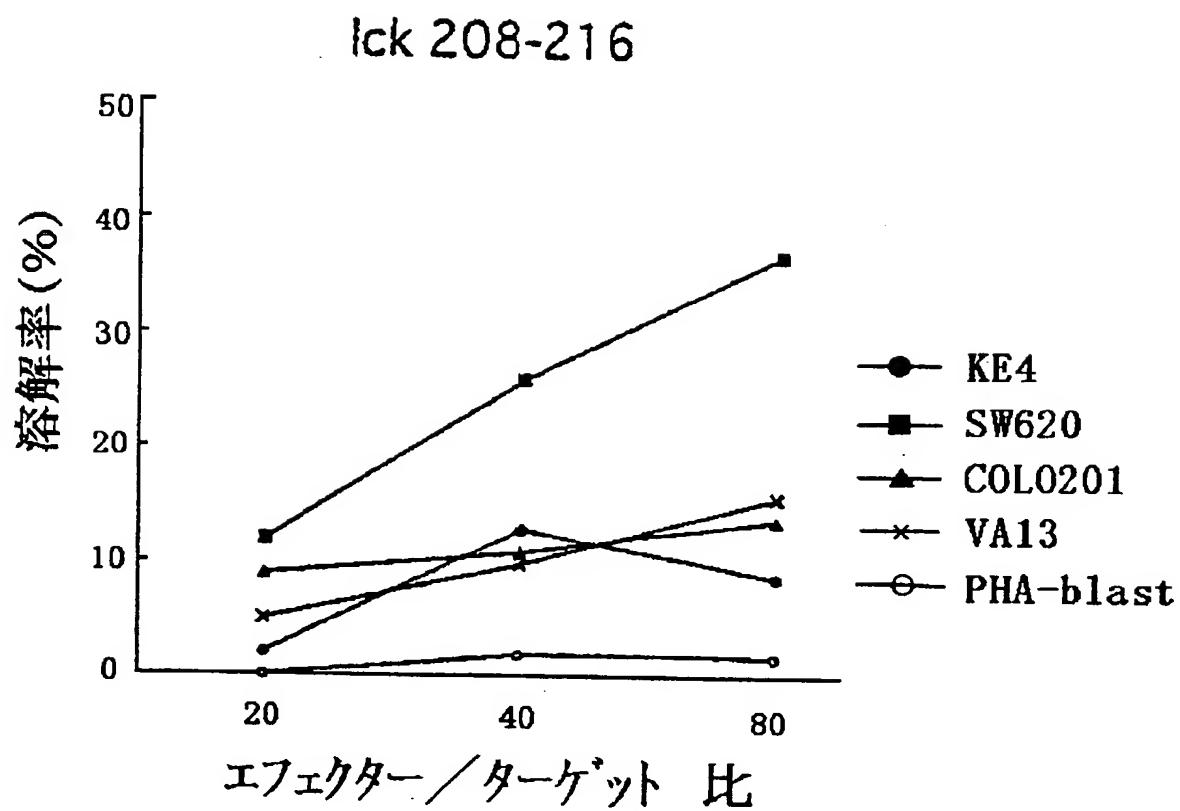
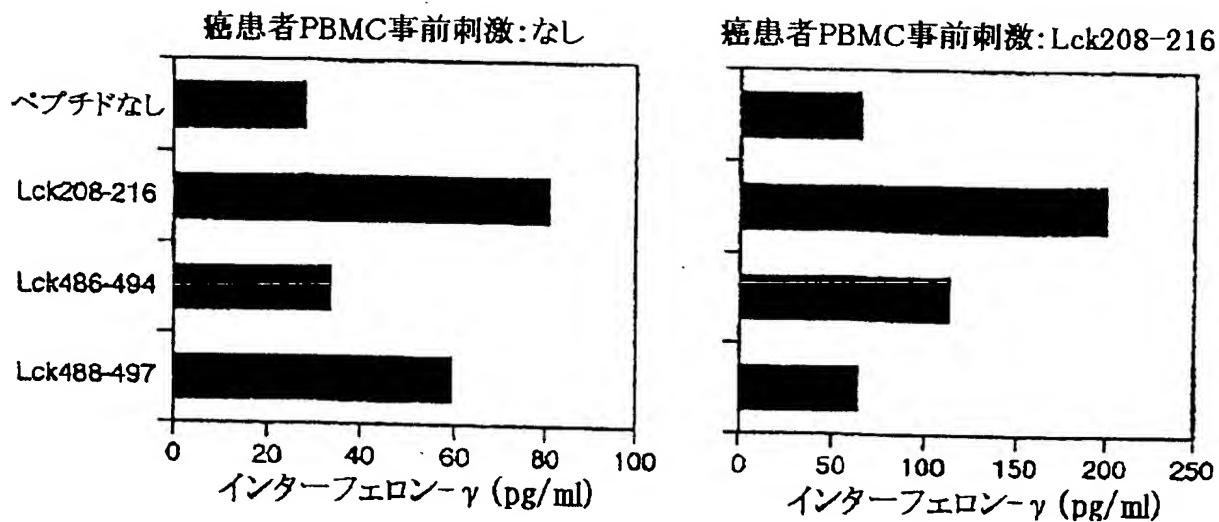


図 9

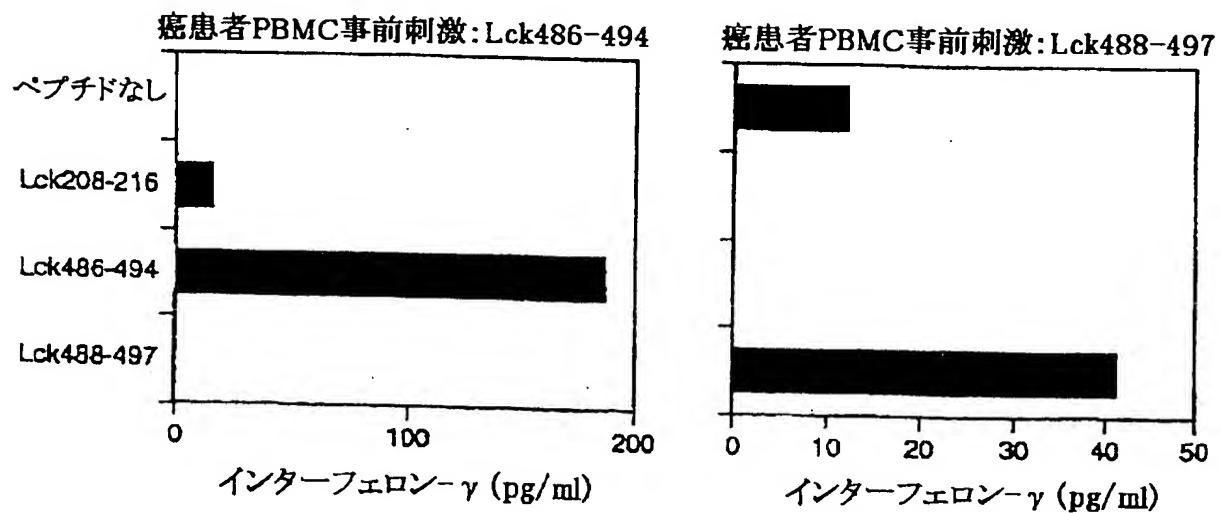
(A)

(B)



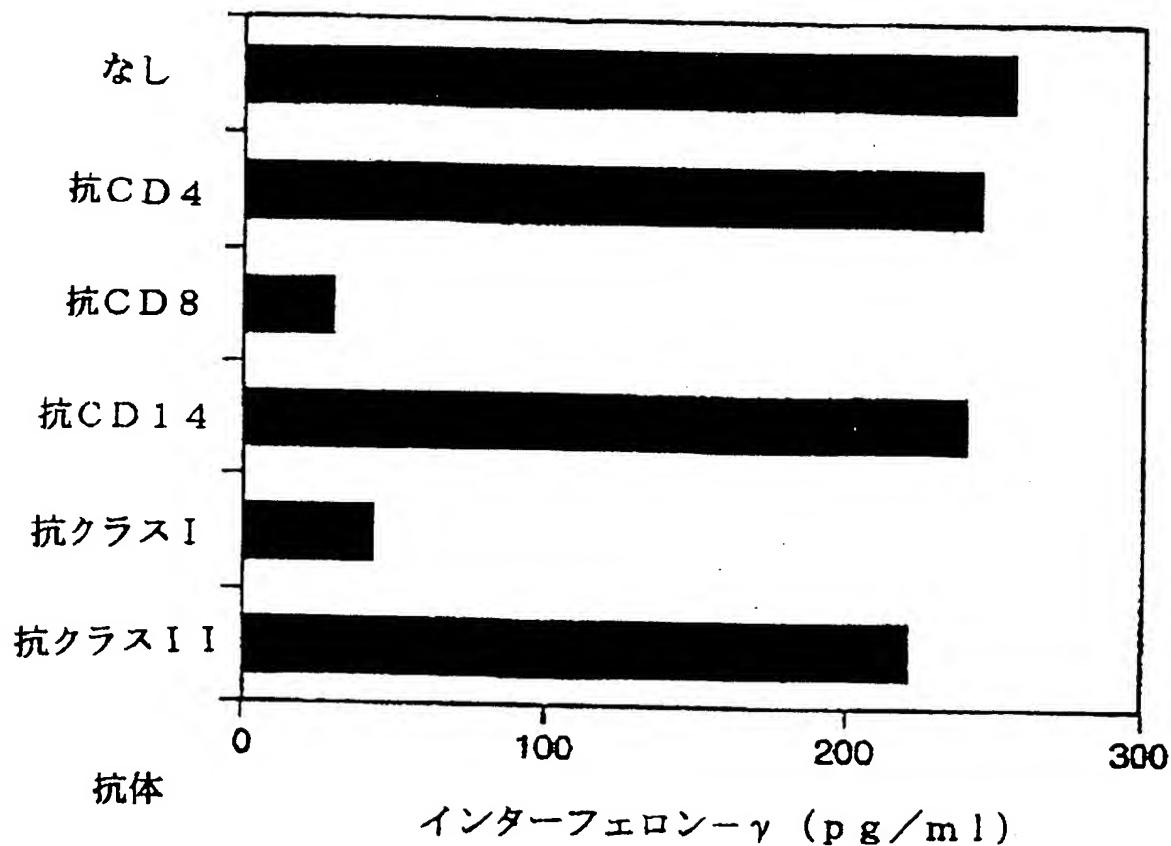
(C)

(D)



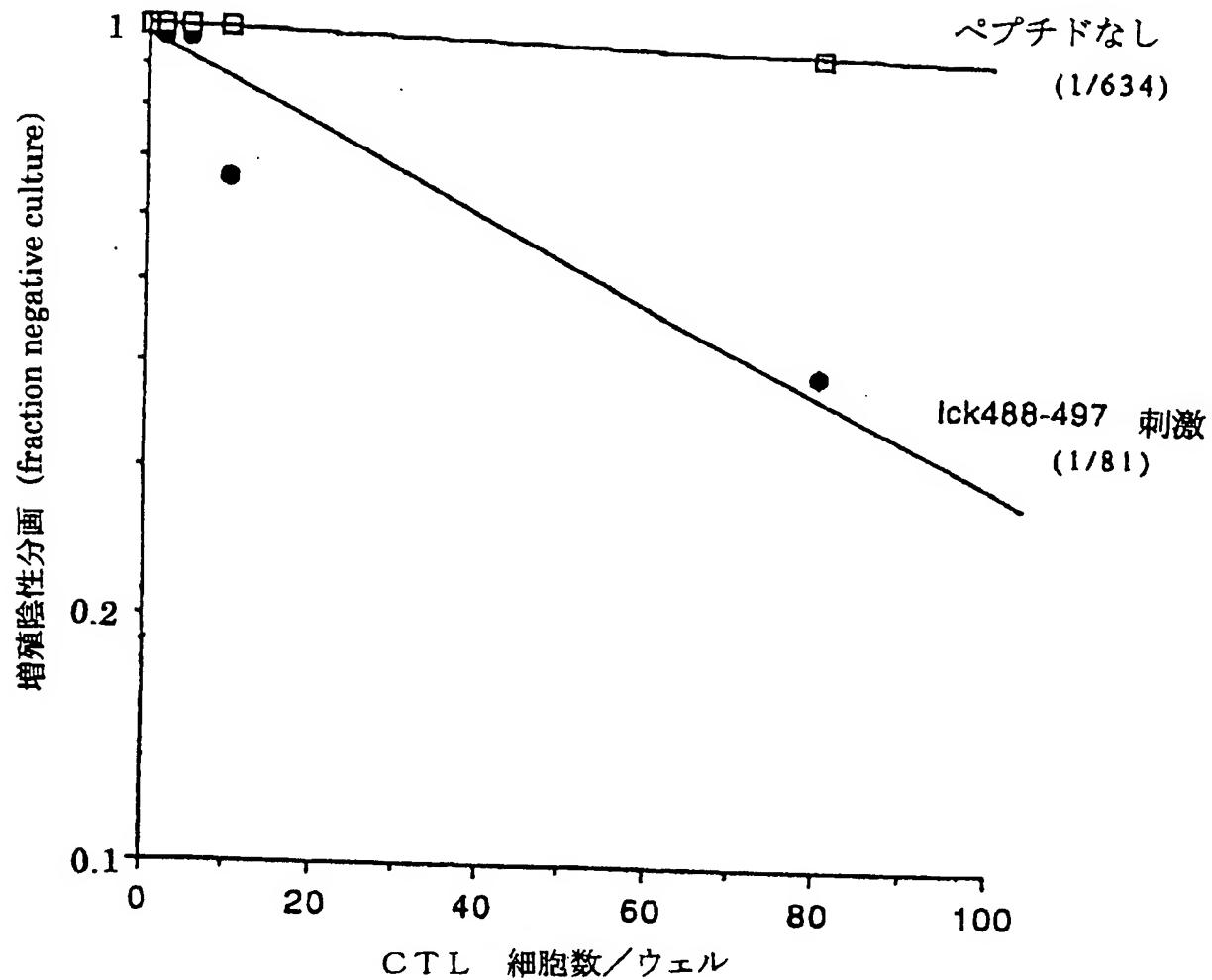
8/15

図10



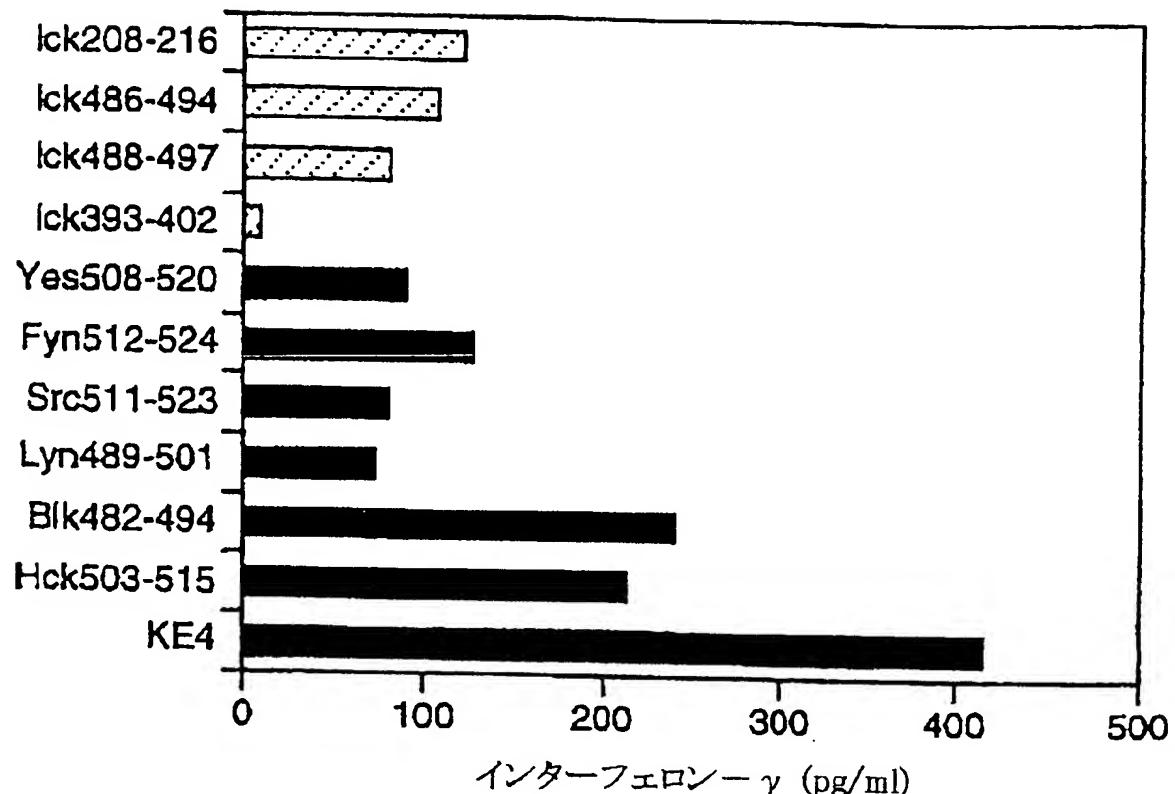
9/15

図 11



10/15

図 1 2



11/15

図13

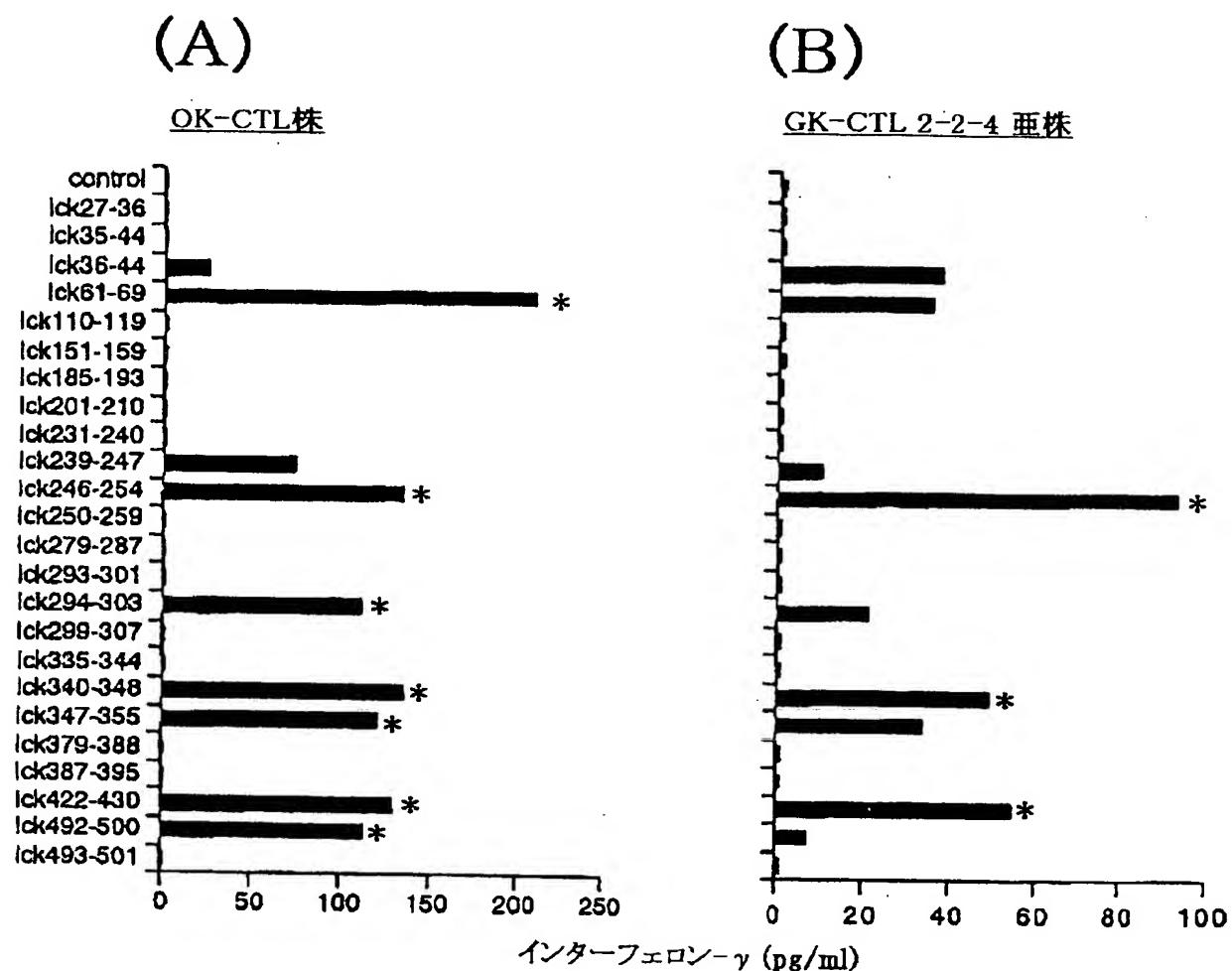
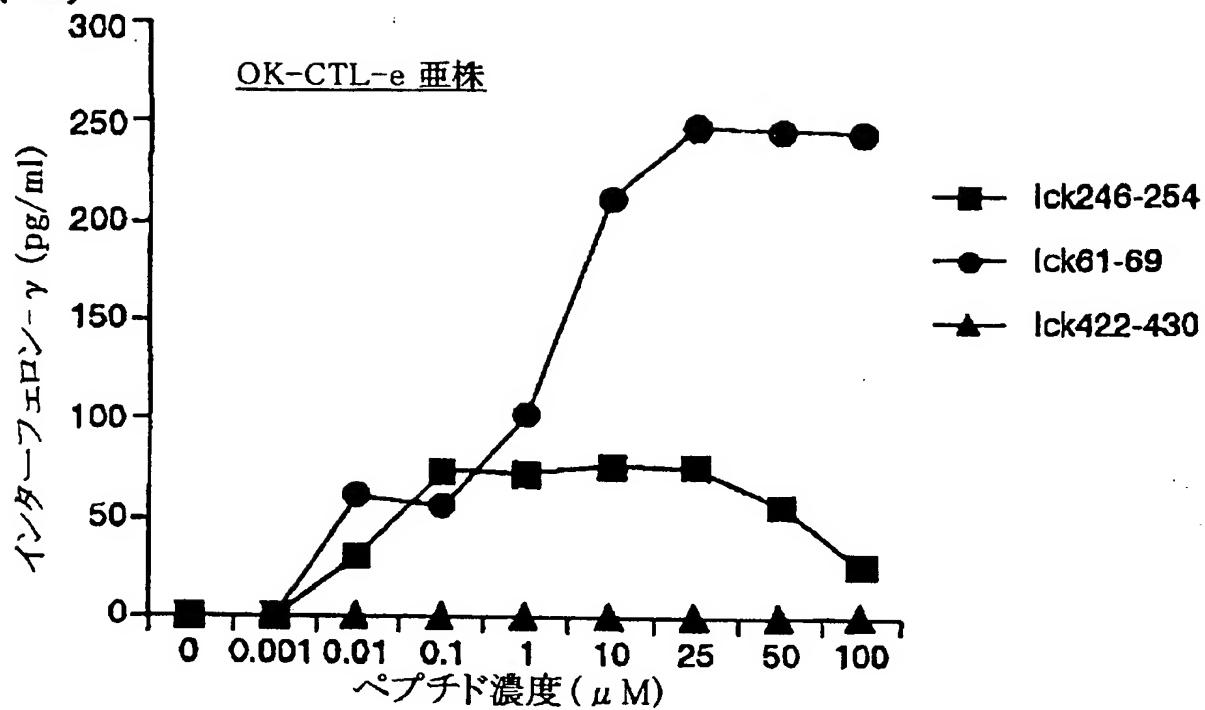
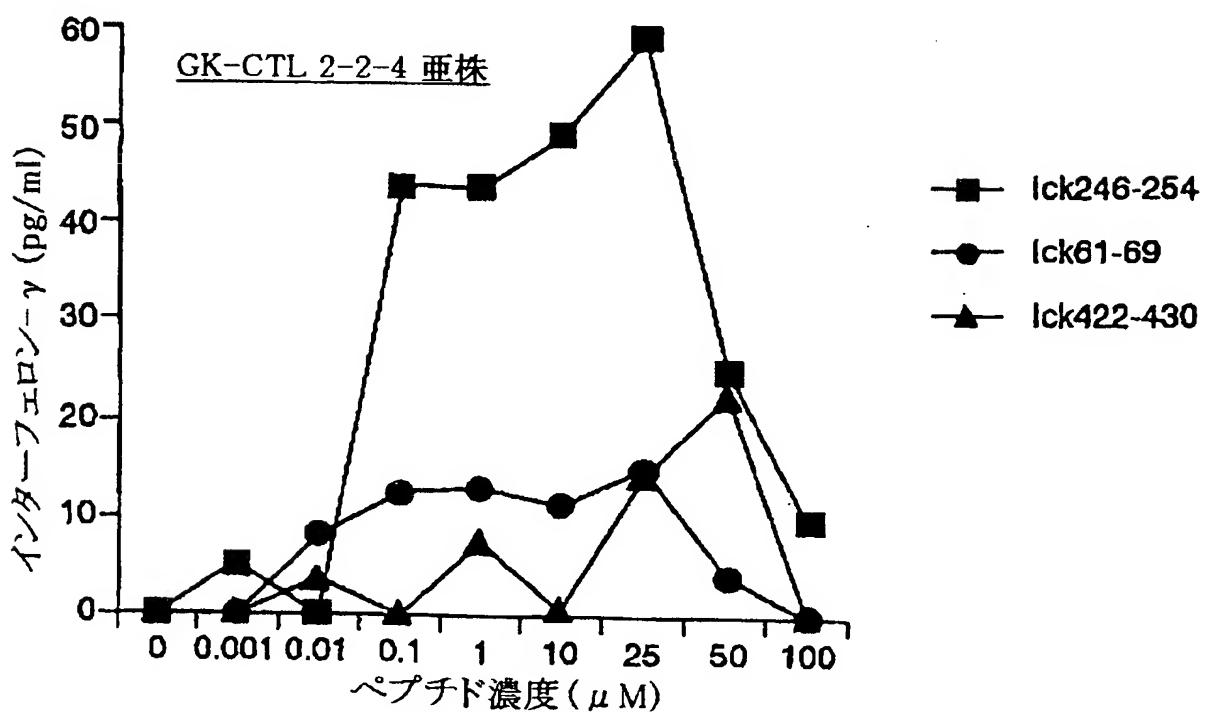


図14

(A)



(B)



(C)

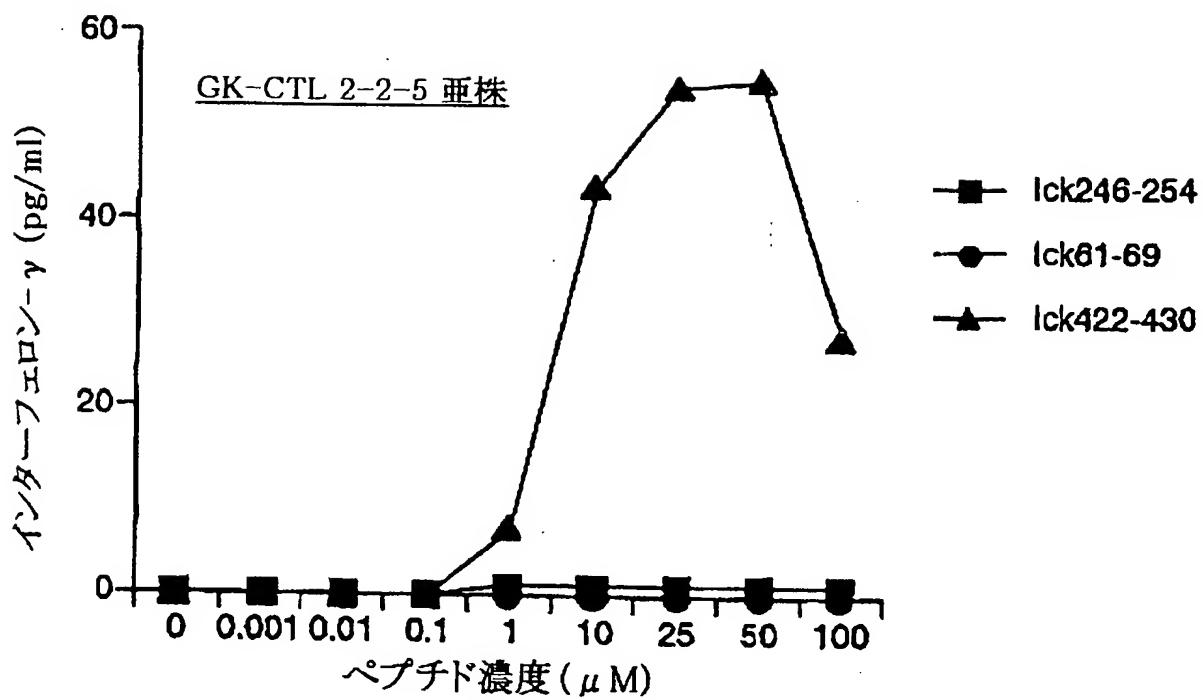
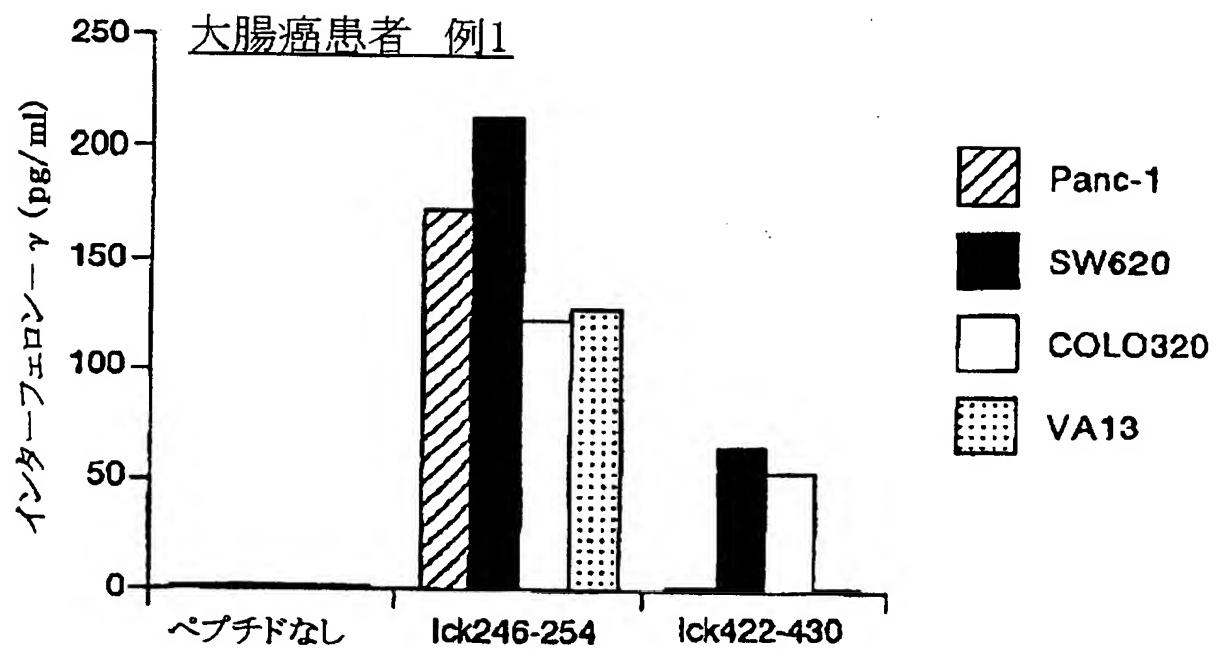
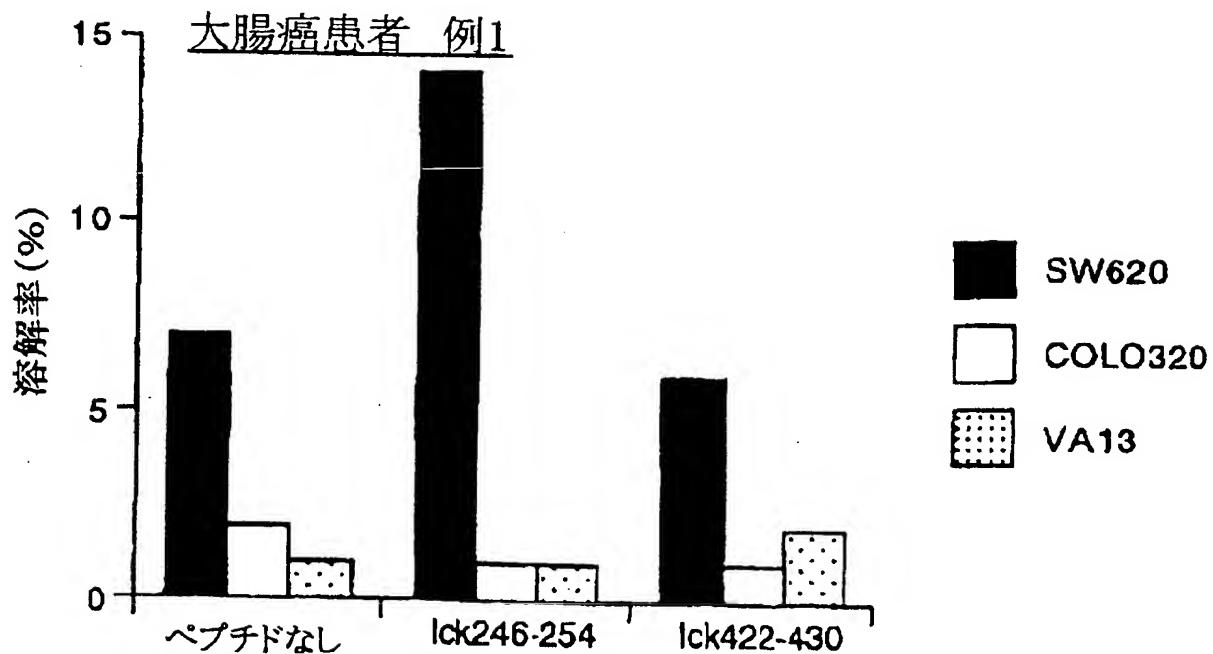


図15

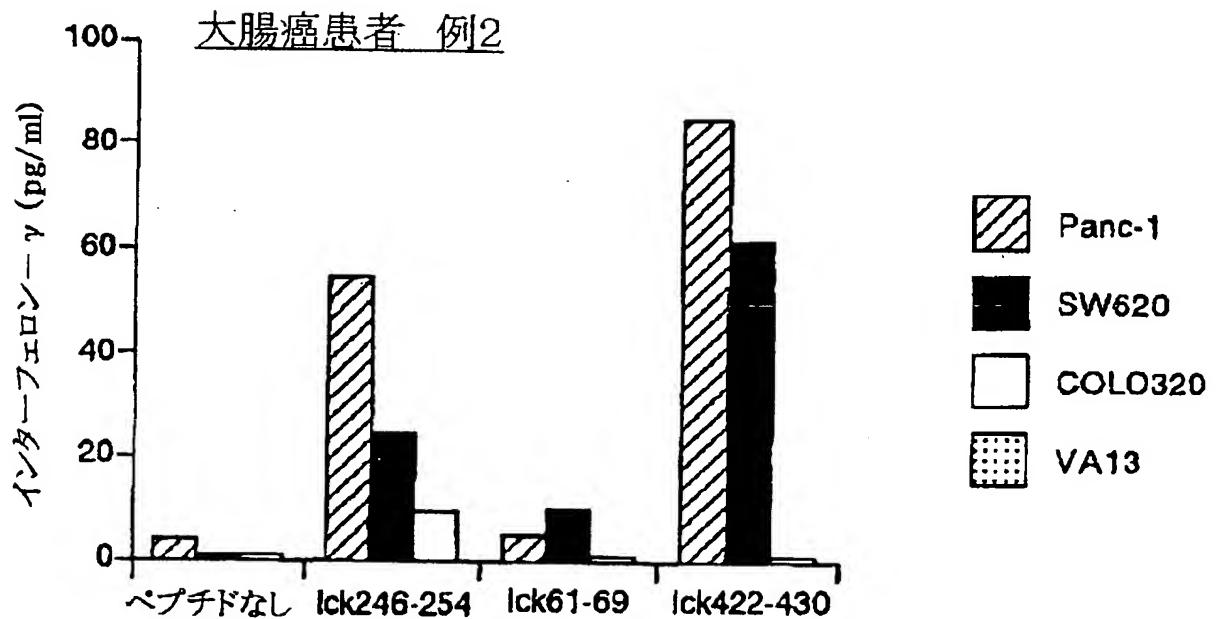
(A)



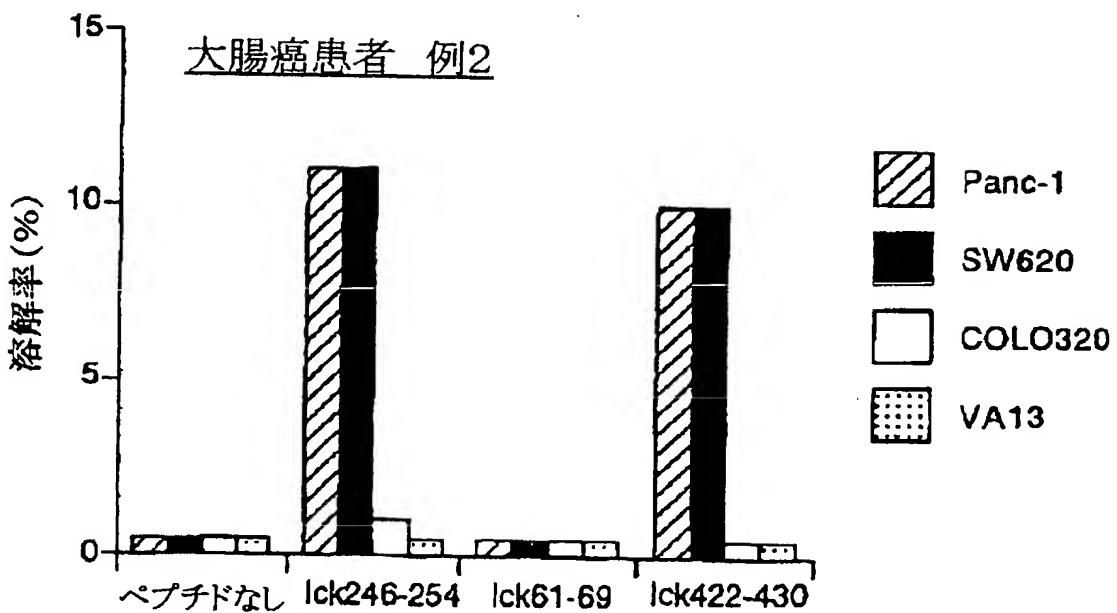
(B)



(C)



(D)



1/5

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Itoh, Kyogo

<120> Tumor antigen

<130> GP00-1017

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

2/5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Phe Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ser Phe Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Phe Asp Tyr Leu Gln Ser Val Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Val Leu
1 5

3/5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Thr Phe Glu Phe Leu Gln Ser Val Leu
1 5

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on amino acid sequence of Src family tyrosine kinases, which peptide has an ability to generate HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes

<220>
<221> UNSURE
<222> (3)
<223> Xaa can be Asp or Glu.

<220>
<221> UNSURE
<222> (4)
<223> Xaa can be Tyr or Phe.

<220>
<221> UNSURE
<222> (5)
<223> Xaa can be Leu or Ile.

<220>
<221> UNSURE
<222> (6)
<223> Xaa can be Arg or Gln.

<220>
<221> UNSURE
<222> (7)
<223> Xaa can be Ser or Ala.

<220>
<221> UNSURE

4/5

<222> (8)

<223> Xaa can be Val or Phe.

<220>

<221> UNSURE

<222> (10)

<223> Xaa can be Glu or Asp.

<220>

<221> UNSURE

<222> (12)

<223> Xaa can be Phe or Tyr.

<220>

<221> UNSURE

<222> (13)

<223> Xaa can be Phe or Tyr.

<400> 10

Thr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Xaa

1

5

10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Gln Asp Asn Leu Val Ile Ala Leu

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala

1

5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5/5

<400> 13

Gln Leu Gln His Gln Arg Leu Val Arg Leu
1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Leu Leu Asp Met Ala Ala Gln Ile
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Ile Ala Glu Gly Met Ala Phe Ile
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Val Leu Glu Asp Phe Phe Thr Ala
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kikuchi M, et. al., "Identification of a SART-1-derived peptide of inducing HLA-A-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T", Int. J. Cancer (1999 May), Vol.81, No.3, p.459-466	1-14,17
A	Koga Y, et. al., "A human T cell-specific cDNA clone (YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases", Eur. J. Immunol. (1986), Vol.16, No.12, p.1643-1646	1-14,17
A	Tanaka A, et. al., "DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes.", Mol. Cell Biol. (1987), Vol.7, No.5, p.1978-1983	1-14,17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
27 October, 2000 (27.10.00)Date of mailing of the international search report
07 November, 2000 (07.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05220

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 15,16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) of the PCT and Rule 29(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05220

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.C1' C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.C1' C12N15/12, C07K14/82, C07K7/00, A61K39/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY(STN), CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kikuchi M, et . al., "Identification of a SART-1-derived peptide of inducing HLA-A-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T", Int. J. Cancer (1999 May), Vol. 81, No. 3, p. 459-466	1-14, 17
A	Koga Y, et. al., "A human T cell-specific cDNA clone(YT16) encodes a protein with extensive homology to a family of protein-tyrosine kinases", Eur. J. Immunol. (1986), Vol. 16, No. 12, p. 1643-1646	1-14, 17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 00

国際調査報告の発送日

07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

上條 勤

4 N 9839



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Tanaka A, et.al., "DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes." , Mol. Cell Biol. (1987), Vol. 7, No. 5, p. 1978-1983	1-14, 17

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 15, 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項15, 16は、人の身体の治療による処置方法、人体の診断方法に該当するものであるから、PCT17条(2)(a)及びPCT規則29(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
INTERNATIONAL BUREAU

(43) INTERNATIONAL PUBLICATION DATE (10) INTERNATIONAL PUBLICATION NUMBER
15 February 2001 (15.02.2001) WO 01/011044 A1

(51) INTERNATIONAL CLASSIFICATION: C12N15/12, C07K14/82, 7/00, A61K39/00, 39/395, 48/00,
45/00, A61P35/00, A61K38/10, G01N33/50, 33/15

(21) INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER: PCT/JP00/05220

(22) INTERNATIONAL APPLICATION DATE: 03 August 2000 (05.08.2000)

(25) LANGUAGE Japanese

(26) Japanese

(30) PRIORITY DATA: TOKUGAN H11-222101 055 August 1999 (05.08.1999) JP

(71) (72) APPLICANT and INVENTOR:

ITOH, Kyogo [JP/JP]; 25-9, Keyakidai 2-chome, Kiyama-machi, Miyaki-gun, Saga 841-0205 (JP).

(74) AGENT:

SHOJI, Takashi, et al; 1F, Daiichi Seno Building, 9-9, Iwamotocho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 (JP).

(81) DESIGNATED STATES (NATIONAL): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) DESIGNATED STATES (REGIONAL): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published

-- with international search report

DESCRIPTION

TUMOR ANTIGEN

TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to a novel tumor antigen, and more particularly to a peptide that is recognized by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes, a polynucleotide encoding the peptide or a complementary strand thereto, a recombinant vector containing the polynucleotide, a transformant containing the recombinant vector, a method for producing the peptide, an antibody against the peptide, a compound having any interaction with these, and a method for screening the compound, a pharmaceutical composition utilizing these, and a means of analysis for the diagnosis utilizing these.

BACKGROUND ART

The immune system, particularly cytotoxic T lymphocytes (which, hereinafter, may be abbreviated to CTLs) play an important role in the exclusion of cancer *in vivo*. An infiltration of cytotoxic T lymphocytes that exhibit a toxic activity against a tumor cell has been detected at the tumor site of a cancer patient (Arch. Surg., 126: 200-205, 1990). A tumor antigen that is a target molecule for the tumor-specific cytotoxic T lymphocytes was first discovered in melanoma type cancers. A tumor antigen generated in a tumor cell is decomposed in the cell into a peptide (tumor antigen peptide) consisting of eight to eleven amino acids, which binds to a human leukocyte

antigen (HLA) molecule that is the major histocompatibility complex to be displayed on the surface of the tumor cell.

HLA is a cell membrane antigen, and is expressed on almost all of eukaryotic cells. HLA is mainly classified as a class I antigen or class II antigen. The HLA recognized together with an antigen peptide by a cytotoxic T lymphocytes is a class I antigen. HLA class I antigens are further classified into HLA-A, B, C, and so on. It was reported that HLA has the genetic polymorphism. The HLA-A24 allele is found in approximately 60% of the Japanese population (in a majority, equal to 95%, the genotype is A2402), 20% of Caucasians, and 12% of Africans. The HLA-A2 allele is found in approximately 40% of Japanese, 53% of Chinese, 49% of North Caucasians, 38% of South Caucasians, and 23% of Black Africans.

A tumor antigen peptide capable of binding to the HLA has a motif in its sequence for each type of HLA. Cytotoxic T lymphocytes injure a tumor cell by recognizing a complex consisting of the tumor antigen peptide and HLA. As used herein, a tumor antigen means a protein or peptide contained in a tumor cell capable of inducing a tumor-specific cytotoxic T lymphocyte. A tumor antigen peptide means a peptide that is generated as a result of degradation of the tumor antigen in a tumor cell and can induce or activate tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by being expressed on the surface of the cells by binding an HLA molecule. In addition, a site of the amino acid sequence capable of inducing tumor-specific cytotoxic T lymphocytes existing in a tumor antigen is called

a tumor antigen epitope (tumor antigen determinant).

Recently, many genes encoding tumor antigens that can be recognized by cytotoxic T lymphocytes have been identified from cDNA of human tumor cells (Science, 254: 1643-1647, 1991; J. Exp. Med., 183: 1185-1192, 1996). Some of these genes are involved in cell proliferation and malignant transformation, including HER/neu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 432-436, 1995), mutant cdk (Science, 269, 1281-1284, 1995), and mutant CASP-8 (J. Exp. Med., 186: 785-793, 1997). Several other gene products such as MAGE (melanoma antigen) family (Cancer Res., 55: 3478-3482, 1995) and SART1 (J. Exp. Med. 187: 277-288, 1998) are preferentially expressed in both of malignant cells and the testis, but not in other normal cells.

Many melanoma-specific tumor antigens exist also in a normal melanocyte, including MART-1/melanA, gp100, and tyrosinase (Oncogene Res., 1: 357-374, 1987). Therefore, human tumor antigens are for the most part not truly tumor-specific antigens, but rather self-antigens that are expressed in some normal cells or tissues.

Now, in Europe and in the United States, a cancer vaccine therapy has been developed that activates cytotoxic T lymphocytes in a cancer patient by an administration of a tumor antigen peptide, and the results of clinical tests have been reported with respect to the melanoma-specific tumor antigen. For example, tumor regression has been observed in 42% of melanoma patients who received the subcutaneous injection of melanoma antigen gp100 peptide and intravenous injection of interleukin-2 (IL-2)

(Nature Medicine, 4: 321, 1998). Thus, by utilizing a tumor antigen as a vaccine, an effective treatment against cancer can be achieved.

However, almost all of the identified tumor antigens are derived from melanoma, and only a few papers have been published on tumor antigens derived from epithelial cancer and adenocarcinoma, which occur at high incidence rates.

Five-year survival rate due to three known major treatment methods for cancer (operation therapy, chemotherapy, and irradiation treatment) was 41% in 1998 with respect to all kinds of cancer. However, it is so far difficult to increase the survival rate, so that the development of a new treatment method is desired other than the above-mentioned three major treatment methods.

The lck gene encoding p56^{lck} protein, which is an src family membrane tyrosine kinase, has an essential role in T cell development and function. Abnormal expression of the lck gene in colon cancer cells and small lung carcinoma cells (Oncogene Res., 1: 357-374, 1987) and aberrant expression in metastatic colon cancer were reported. However, detailed roles of Lck protein in these cancer cells are still unknown, although it is suggested that Lck protein plays an important role in the process of neoplastic transformation (Cancer Res., 58: 4660-4666, 1998),

DISCLOSURE OF THE INVENTION

Considering the above-mentioned state, the present invention aims to find out and provide a new tumor antigen that is recognized by cytotoxic

T lymphocytes and is useful for the specific immunotherapy for patients having adenocarcinoma and/or epithelial cancers, such as colon cancer and lung cancer.

Concretely, the purpose of the present invention is to find out and provide a peptide having an antigen epitope that is recognized by at least HLA-A2402-restricted or HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes and is encoded by the lck gene. In more detail, the purpose of the present invention is to provide a peptide that is recognized by HLA-A2402-restricted or HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes, a polynucleotide encoding the peptide or a complementary strand thereto, a recombinant vector containing the polynucleotide, a transformant containing the recombinant vector, a method for producing the peptide, an antibody against the peptide, a compound that interacts with these entities and a method for screening for such a compound, a pharmaceutical composition utilizing these entities, and a means for the diagnosis utilizing these entities.

To solve the subject, the inventor established KE4-CTL, which is an HLA-A2402-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocyte, that are activated by recognizing HLA-A24 and a tumor antigen peptide, and OK-CTL and GK-CTL, which are HLA-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes, that are activated by recognizing HLA-A2 and a tumor antigen peptide, and then identified a tumor antigen capable of activating the tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from a cDNA library of KE tumor cell line using the gene expression cloning method, and finally

found out a peptide having an epitope of the tumor antigen that is recognized by HLA-A2402-restricted and/or HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes, and accomplished the present invention.

The present invention comprises:

(1) a peptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17 of the sequence listing,

(2) a peptide having the amino acid sequence shown by the formula (SEQ ID NO:10 in the sequence listing)

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii, wherein Xaa is Asp or Glu, Xbb is Tyr or Phe, Xcc is Leu or Ile, Xdd is Arg or Gln, Xee is Ser or Ala, Xff is Val or Phe, Xgg is Glu or Asp, Xhh is Phe or Tyr, and Xii is Phe or Tyr,

(3) an inducer of cytotoxic T lymphocytes comprising at least peptide (1) or (2),

(4) a method for inducing cytotoxic T lymphocytes using peptide (1) or (2),

(5) a cancer vaccine comprising at least peptide (1) or (2),

(6) a polynucleotide encoding peptide (1) or (2) or a complementary strand thereto,

(7) a polynucleotide that hybridizes to polynucleotide (6) or a complementary strand thereto under a stringent condition,

(8) a recombinant vector comprising polynucleotide (6) or (7) or a complementary strand thereto,

(9) a transformant transformed with recombinant vector (8),

(10) a method for producing a peptide, which comprises a step of culturing

transformant (9),

- (11) an antibody that immunologically recognizes peptide (1) or (2),
- (12) a method for screening for a compound that interacts with peptide (1) or (2) and enhances the recognition ability by at least HLA-A2402-restricted and/or HLA-2-restricted cytotoxic T lymphocytes, and/or a compound that interacts with polynucleotide (6) or (7) and enhances the expression thereof, wherein at least one entity is used that is selected from a group consisting of peptides (1) and(2), polynucleotides (6) and(7), recombinant vector (8), transformant (9), and antibody (11),
- (13) a compound obtained by screening method (12),
- (14) a pharmaceutical composition comprising at least one entity selected from the group consisting of peptides (1) and (2), polynucleotides (6) and (7), recombinant vector (8), transformant (9), antibody (11), and compound (13) in an amount effective for treating cancer,
- (15) a method for treating cancer characterized by using inducer (3) of cytotoxic T lymphocytes, cancer vaccine (5), or pharmaceutical composition (14),
- (16) a method for diagnosing a disease relevant to the expression or activity of peptide (1) or (2), wherein the method comprises a step where a polynucleotide encoding (a) the polypeptide and/or (b) the peptide in a specimen derived from an individual are/is analyzed as marker(s), and
- (17) a reagent kit used for method (16), wherein the kit consists of at least one entity selected from the group consisting of peptides (1) and (2), polynucleotides (6) and (7), and antibody (11).

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Fig. 1 illustrates the interferon- γ (IFN- γ) production by the activated HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes (KE4-CTL) by the recognition of lck gene product.

Fig. 2 illustrates the interferon- γ (IFN- γ) production by the activated HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes by the recognition of lck gene product. (A) OK-CTL-e subline was used as the HLA-A2-restricted CTLs. (B) GK-CTL2-2-4 subline was used as the HLA-A2-restricted CTLs. (C) GK-CTL2-2-5 subline was used as the HLA-A2-restricted CTLs.

Fig. 3 illustrates an amount of the interferon- γ (IFN- γ) produced from KE-CTLs stimulated by C1R/A2402 cells transfected with a peptide derived from Lck.

Fig. 4 illustrates the dose-dependent activation of KE-CTLs by the peptide derived from Lck.

Fig. 5 illustrates the phenotype and MHC restriction of KE-CTLs confirmed by testing the recognition of the peptide by KE-CTLs in the presence of various antibodies. (A) Lck208-216 was used as a peptide derived from Lck. (B) Lck486-494 was used as a peptide derived from Lck. (C) Lck488-497 was used as a peptide derived from Lck.

Fig. 6 illustrates the difference in the peptide recognition among KE4-CTL sublines. (A) Subline #19 was used. (B) Subline #49 was used. (C) Subline #93 was used. (D) Clone #80 was used.

Fig. 7 illustrates that a peptide derived from Lck can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood

mononuclear cells (PBMCs) of a cancer patient. The IFN- γ produced from CTLs was investigated as an indicator for the induction, using tumor cells such as KE·4 (HLA-A24 $^+$), SW620 (HLA-A24 $^+$), and COLO201 (HLA-A24 $^-$) as target cells.

Fig. 8 illustrates the cytotoxic activity of CTLs induced by a peptide derived from Lck against various tumor cells. The activity was examined by the ^{51}Cr -release test. (A) Lck488-497 was used as the peptide. (B) Lck208-216 was used as the peptide.

Fig. 9 illustrates the specificity of CTLs induced by a peptide from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a colon cancer patient against the peptide. (A) Any peptide was not used in the preliminary stimulation of PBMCs of a cancer patient. (B) Lck208-216 was used as the peptide in the preliminary stimulation of PBMCs of a cancer patient. (C) Lck486-494 was used as the peptide in the preliminary stimulation of PBMCs of a cancer patient. (D) Lck488-497 was used as the peptide in the preliminary stimulation of PBMCs of a cancer patient.

Fig. 10 illustrates the phenotype and the MHC restriction of induced CTLs confirmed by investigating the induction of the CTLs from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a colon cancer patient by a peptide in the presence of each of various antibodies.

Fig. 11 illustrates the frequency of CTL precursor cells induced by a peptide in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a colon cancer patient. The abscissa indicates the number of CTLs added per well. The ordinate indicates the fraction of negative culture. With respect to the

ordinate, "1" indicates that CTLs are not induced, so that 100% of target cells to be lysed by CTLs survived, "0.2" indicates that all the target cells were killed (CTL precursor cell frequency = 1/96).

Fig. 12 illustrates the activation of KE4·CTLs by a peptide derived from Src family.

Fig. 13 illustrates the result of the analysis of HLA·A2-restricted CTL-activating ability of a peptide derived from Lck. (A) OK·CTL line was used as the HLA·A2-restricted CTL. (B) GK·CTL2·2·4 subline was used as the HLA·A2-restricted CTL.

Fig. 14 illustrates the dose-dependent activation of HLA·A2-restricted CTLs of a peptide derived from Lck. (A) OK·CTL-e subline was used as CTLs. (B) GK·CTL2·2·4 subline was used as CTLs. (C) GK·CTL2·2·5 subline was used as CTLs.

Fig. 15 indicates that a peptide derived from Lck can induce HLA·A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a cancer patient. (A) The induction of CTLs from PBMCs derived from colon cancer patient (case 1) was investigated using the IFN- γ production as an indicator. (B) The induction of CTLs from colon cancer patient (case 1) was confirmed by the cytotoxicity test. (C) The induction of CTLs from PBMCs derived from colon cancer patient (case 2) was investigated using the IFN- γ production as an indicator. (D) The induction of CTLs from colon cancer patient (case 2) was confirmed by the cytotoxicity test.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

(Identification of lck gene)

The inventor has been taking a notice of HLA-A24, which is a type of HLA-A molecule found in many Japanese, and established HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (KE4-CTL) that are activated by recognizing the HLA-A24 and a tumor antigen peptide from an esophageal cancer patient (Int. J. Cancer, 81: 459-466, 1999). Using the cytotoxic T lymphocytes as an effector, a tumor antigen capable of activating the cells was identified from a cDNA library of KE tumor cell line by the gene expression cloning method. The activation of the cytotoxic T lymphocytes was investigated by measuring interferon- γ (IFN- γ) produced from the cytotoxic T lymphocytes using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

As a result, it was found that one cDNA clone is recognized by HLA-A24-restricted KE4-CTLs, and activates the KE4-CTLs (see Fig. 1), and that the nucleotide sequence of the cDNA clone is 1,750-base-pair (bp)-long and has a homology to position 283-2,032 at 100% in the nucleotide sequence of lck gene. The nucleotide sequence of lck gene in this position corresponds to the amino acid sequence of position 31-506, which is almost all of the part of Lck protein consisting of 509 amino acids.

Namely, a cell, which was made to express lck gene and HLA-A2402 by the genetic engineering technique, activated KE-CTLs, so that it was confirmed that the protein encoded by lck gene is a tumor antigen capable of activating HLA-A2402-restricted CTLs.

In addition, Lck protein proved to be a tumor antigen capable of activating not only HLA-A24-restricted CTLs but also HLA-A2-restricted CTLs by the investigation using three HLA-A2-restricted CTLs, i.e., CTL lines established from a colon cancer patient [OK-CTL-e subline (HLA-A0207)] (J. Immunol., 163: 4999-5004, 1999) and CTL lines established from a lung cancer patient [GK-CTL2-2-4 subline and GK-CTL2-2-5 (HLA-A0206)] in a manner similar to one described above (see Fig. 2).

Thus, the lck gene proved to encode a tumor antigen epitope recognized by HLA-A24-restricted or HLA-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.

(Tissue distribution of Lck protein)

Expression of Lcks (56kD and 59kD) at the protein level in various cells and tissues was examined by the Western blot analysis using an anti-Lck monoclonal antibody.

Lck protein was detected in all the tested malignant tumor cell lines such as squamous cell carcinoma (SCC) or adenocarcinoma cell line, and in almost all of fresh tumor tissues obtained from various organs such as esophageal carcinoma, pulmonary SCC, and pulmonary adenocarcinoma. Lck protein was expressed especially in the tissues of colon cancer, pulmonary cancer, and esophageal carcinoma at a high level, while it was not detected in any non-tumorous colon tissues at all. In addition, Lck protein was not detected in unstimulated peripheral blood mononuclear

cells (PBMCs) but was detected in a cytoplasmic fraction of activated PBMCs (PHA·blast) after the stimulation by phytohemagglutinin (PHA) at 10 µg/ml for 48 h.

(Peptide capable of activating HLA·A2402·restricted CTL)

In order to obtain a peptide capable of binding to HLA·A2402 molecule derived from Lck protein, a peptide having an HLA·A24 binding motif was searched for in the literature, and then thirteen peptides (9-mers and 10-mers) were synthesize based on the sequence consisting of 509 amino acids of the lck gene product (Nature, 319: 682·685, 1986). Some amino acids in some of these thirteen peptides were substituted for the lck gene product.

A tumor antigen peptide capable of activating cytotoxic T lymphocytes was selected from 13 peptides by assaying IFN·γ produced from CTLs as an indicator for its CTL·activating action.

Among these peptides, three peptides [Lck208·216 (SEQ ID NO:3), Lck486·494 (SEQ ID NO:1), Lck488·497 (SEQ ID NO:2)] exhibited a CTL·activating ability, and enhanced the production of IFN·γ by CTLs (see Fig. 3). The CTL·activating ability of Lck486·494 (SEQ ID NO:1) or Lck488·497 (SEQ ID NO:2) showed a dose·dependency, which was detected at 1 nM or so. On the other hand, the activity of Lck208·216 (SEQ ID NO:3) was detected at 100 nM or higher (see Fig. 4).

The activation of KE4·CTLs by these three peptides was inhibited by anti·CD3, anti·CD8, and anti·MHC class I monoclonal antibody, but not

inhibited by anti-CD4, anti-MHC class II and anti-CD13 monoclonal antibody. Therefore, KE4-CTLs proved to have a phenotype of CD3⁺, CD8⁺, and CD4⁻.

(Induction of HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte by peptide)

Three peptides that activate HLA-A24-restricted KE-CTLs in a dose-dependent manner [Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), or Lck488-497 (SEQ ID NO:2)] also induced HLA-A24-restricted CTLs against tumor cell lines (KE4, SW620 and COLO201) expressing Lck from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from a colon cancer patient.

Namely, when stimulation was carried out in vitro three times using Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), or Lck488-497 (SEQ ID NO:2), and further using irradiated autologous PBMCs pulsed with a corresponding peptide as antigen-presenting cells (APCs), especially PBMCs stimulated by Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) produced a greater amount of IFN- γ in the reaction against HLA-A24⁺ tumor cell (KE4 and SW620) than in the reaction against HLA-A24⁻ tumor cell (COLO201).

On the other hand, from PBMCs obtained from a healthy donor HLA-A24-restricted CTLs were not induced by these three peptides, when stimulation was performed using irradiated autologous PBMCs pulsed with one of these three peptides as antigen-presenting cells (APCs), (see Table 3). However, when the stimulation was carried out using dendritic cells

(DCs) that were pulsed with a peptide as APCs, these three peptides induced HLA-A24-restricted CTLs from PBMCs obtained from a healthy donor.

In addition, CTL activity induced by the above-mentioned peptide was confirmed by the ^{51}Cr -release test. PBMCs stimulated with these three peptides derived from Lck lysed HLA-A24 $^+$ KE tumor cells and SW620 tumor cells, but did not lyse HLA-A24 $^+$ PHA-activated T lymphocytes obtained from a healthy donor or HLA-A24 $^-$ COLO201 tumor cells.

The above-mentioned peptides derived from Lck could induce HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in PBMCs of a colon cancer patient. In addition, a peptide derived from Lck could not induce HLA-A24-restricted CTL activity against a tumor cell with respect to PBMCs of a healthy donor. These results suggest that T lymphocytes in the peripheral blood of a healthy donor are immunologically tolerant to Lck. The Lck peptide according to the present invention can induce CTLs in PBMCs of a colon cancer patient.

(Induction of HLA-A24-restricted CTL by peptide derived from Src family)

Among the above-mentioned three peptides capable of inducing CTLs that recognize HLA-A24 $^+$ tumor cell line, two peptides were found to have a homology on the amino acid sequences, that is Lck486-494 (SEQ ID NO:1) (TFDYLRSVL) and Lck488-497 (SEQ ID NO:2) (DYLRSVLEDF) (amino acid sequence is given both in one-letter symbols and three-letter

symbols hereafter). CTLs that recognize the amino acid sequence DYLRSV, which is a common region for the two peptides as an epitope, are assumed to have a relevance to tumor rejection.

Search for a peptide having a homology to the amino acid sequence revealed that some tyrosine kinases belonging to the Src family including Lck (Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930, 1985) contain a homologous peptide (see Table 5).

Peptides that were synthesized based on the amino acid sequence of a peptide derived from the Src family, i.e., Src511-519 (SEQ ID NO:4) (TFEYLQAFL), Yes508-516 (SEQ ID NO:5) (TFEYIQSFL), Fyn512-520 (SEQ ID NO:6) (TFEYLQSFL), Lyn489-497 (SEQ ID NO:7) (TFDYLQSVL), Hck503-511 (SEQ ID NO:8) (TFEYIQSVL), and Blk482-490 (SEQ ID NO:9) (TFEFLQSVL) also exhibited an ability to activate HLA-A24-restricted CTL that is comparable to a peptide derived from Lck or more.

Peptides according to the present invention also include a peptide that has the amino acid sequence shown by the following formula derived by the amino acid sequence of the above-mentioned homologous peptide, and is recognized at least by HLA-A2402-restricted cytotoxic T lymphocytes: Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii, wherein Xaa is Asp or Glu, Xbb is Tyr or Phe, Xcc is Leu or Ile, Xdd is Arg or Gln, Xee is Ser or Ala, Xff is Val or Phe, Xgg is Glu or Asp, Xhh is Phe or Tyr, and Xii is Phe or Tyr.

by peptide derived from Src family)

The above-mentioned peptide derived from the Src family could induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes from PBMCs obtained from a cancer patient. Namely, PBMCs obtained from a cancer patient that were stimulated with a peptide derived from the Src family reacted with a KE4 cell and a SW620 cell to produce IFN- γ . Production of IFN- γ from PBMCs was induced by Lck486-494 (SEQ ID NO:1, 4 cases among 7 cases of cancer patient), Src511-519 (SEQ ID NO:4, 2 cases among 3 cases), Yes508-516 (SEQ ID NO:5, 1 case among 3 cases), Fyn512-520 (SEQ ID NO:6, 1 case among 2 cases), Hck503-511 (SEQ ID NO:8, 2 cases among 2 cases), and Blk482-490 (SEQ ID NO:9, 1 case among 2 cases).

Three Lck peptides and peptides derived from Src family according to the present invention can induce HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in PBMCs of a colon cancer patient. Therefore, peptides according to the present invention can be used as an agent to induce tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and as a method for inducing tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. In addition, Lck is detected in a majority of cancer tissues including colon, lung and esophagus. The HLA-A24 allele is detected in approximately 60% of the Japanese population (in a majority, equal to 95%, the genotype is A2402), 20% of Caucasians, and 12% of Africans (HLA 1991, Vol.1: 1065-1220, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992). Therefore, peptides according to the present invention can be used in the specific immunotherapy for a relatively large number of cancer patients.

(Peptide capable of activating HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte)

Since Lck protein is recognized also by HLA-A2-restricted CTLs, a peptide having an HLA-A2 binding motif was searched for in the literature in order to obtain peptides derived from Lck capable of binding to HLA-A2 molecule, and 24 kinds of peptides (9-mers and 10-mers) were synthesized based on the sequence consisting of 509 amino acids of lck gene product (Nature, 319: 682-685, 1986). The capability of each peptide for CTL activation was investigated by assaying IFN- γ produced from CTLs as an indicator, wherein the OK-CTL line or GK-CTL subline 2-2-4 was used as a CTL.

Among these peptides, 7 peptides [Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), Lck294-303 (SEQ ID NO:13), Lck340-348 (SEQ ID NO:14), Lck347-355 (SEQ ID NO:15), Lck422-430 (SEQ ID NO:16), or Lck492-500 (SEQ ID NO:17)] could activate CTLs, and enhanced the IFN- γ production by CTLs [see Figs.13 (A) and (B)]. There seemed to be a dose-dependency on the ability of Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), or Lck422-430 (SEQ ID NO:16) to activate CTLs [see Figs.14 (A), (B) and (C)].

(Induction of HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte by peptide)

In addition, among three peptides that activate HLA-A2-restricted CTLs with a dose-dependency [Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), and Lck422-430 (SEQ ID NO:16)], Lck246-254 (SEQ ID NO:12) or Lck422-430 (SEQ ID NO:16) induced HLA-A2-restricted CTLs against

tumor cell lines Panc-1 and SW620 from PBMCs of a metastatic colon cancer patient.

Namely, when PBMCs of a metastatic colon cancer patient were stimulated in vitro three times with one of these three peptides and then, using irradiated autologous PBMCs pulsed with a corresponding peptide as antigen-presenting cells (APCs), PBMCs of the colon cancer patient that were stimulated with Lck246-254 (SEQ ID NO:12) or Lck422-430 (SEQ ID NO:16) did not react with HLA-A2⁻ colon cancer cell line COLO320, but did react with HLA-A2⁺ colon cancer cell line SW620 and HLA-A2⁺ pancreatic cancer cell line Panc-1 to produce INF- γ [see Figs.15(A) and (C)] and lyse HLA-A2⁺ tumor cells [see Figs.15(B) and (D)].

(Induction of HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte in cancer patient)

Lck246-254 (SEQ ID NO:12) and Lck422-430 (SEQ ID NO:16) could induce HLA-A24-restricted CTLs not only from PBMCs obtained from a colon cancer patient, but also from PBMCs obtained from a metastatic pulmonary cancer patient and an esophagus cancer patient. The induction of HLA-A2-restricted CTLs was investigated using the production of IFN- γ against HLA-A2⁺ colon cancer cell line SW620 as an indicator. HLA-A2-restricted CTLs were induced in PBMCs by Lck246-254 (SEQ ID NO:12, 2 cases among 6 cases of cancer patient) or Lck422-430 (SEQ ID NO:16, 3 cases among 6 cases of cancer patient) (see Table 8). Therefore, these three peptides can be used as inducers for and a method for inducing cytotoxic T lymphocytes. In addition, the HLA-A2 allele is found in

approximately 40% of the Japanese population, 49% of North Caucasians, 38% of South Caucasians, 23% of Africans, and 53% of Chinese (HLA 1991, Vol.1: 1065-1220, Oxford Scientific Publications, 1992). Therefore, these peptides are applicable for use in the specific immunotherapy for a relatively large number of patients.

(Peptides)

A peptide according to the present invention is a peptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17 in the sequence listing. The peptide according to the present invention can induce or activate HLA-A24-restricted or HLA-A2-restricted cytotoxic T cells.

A peptide according to the present invention can be a peptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:10 in the sequence listing and can induce and/or activate at least HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes. The peptide capable of inducing or activating HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes can be selected by the method described below.

A peptide according to the present invention can be a peptide capable of inducing and/or activating both HLA-24-restricted CTLs and HLA-2-restricted CTLs.

Based on thus specified peptides, using at least the strength of the recognition property by HLA-A2402-restricted and/or HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes as an index, peptides are also provided having

amino acid sequences with mutation or induced mutation such as deletion, substitution, and addition of one amino acid or more. Mutation or induced mutation such as deletion, substitution, and addition can be introduced by well-known means such as Ulmer's technique (Ulmer, L.M., Science, 219, 666, 1983). In addition, some modification can be made on these available peptides to such an extent that does not cause a remarkable change in their function, for example, modification of the constitutive amino group or carboxyl group.

With respect to the protein encoded by the lck gene, some variants are known having a different amino acid sequence in part that are presumed to be based on the polymorphism (Nature, 319: 682-685, 1986; Eur. J. Immunol., 16: 1643-1646, 1986; J. Cell. Biochem., 38, 117-126, 1988; Gene, 84: 105-113, 1989). Peptides according to the present invention include peptides that are derived from the lck gene product having a different amino acid sequence and can induce HLA-A24-restricted and/or HLA-A2-restricted CTLs.

For example, Lck488-497, which is one of the peptides according to the present invention, has the amino acid sequence DYLRSVLEDF described in SEQ ID NO:2 of the sequence listing, while the amino acid sequence of position 488-497 based on the amino acid sequence of Lck protein reported in Nature, 319: 682-685, 1986 is DYLRSVLDDF, which is also included in HLA-A24-binding motif.

Peptides according to the present invention are tumor antigenic peptides capable of inducing and/or activating HLA-A24-restricted and/or

HLA-A2-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes, and can be used to induce and/or activate tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. Namely, peptides according to the present invention can be used for the specific immunotherapy for cancer, for example, as a cancer vaccine.

(Polynucleotide)

Polynucleotides and complementary strands thereto according to the present invention are polynucleotides encoding amino acids of peptides of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 or 17, or peptides having mutation or induced mutation such as deletion, substitution, and addition of one amino acid or more in the amino acid sequences of these peptides and recognized at least by HLA-A2402 restricted and/or HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes, and complementary strands thereto. In addition, polynucleotides according to the present invention include polynucleotides that hybridize to these polynucleotides under a stringent condition. In the case where the polynucleotide molecule is a DNA molecule, "a DNA molecule that hybridizes to a DNA molecule under a stringent condition" can be obtained, for example, by the method described in the above-mentioned "Molecular Cloning". "To hybridize under a stringent condition" herein means that a signal of positive hybridization is still observed even after, for example, incubating at 42°C in a solution containing 6xSSC, 0.5%SDS and 50% formamide, followed by washing at 68°C in a solution containing 0.1xSSC and 0.5%SDS.

Polynucleotides according to the present invention provide the

genetic information useful for producing peptides according to the present invention, and can be utilized also as reagents and standards of nucleic acid.

(Transformant)

The present invention can provide peptides according to the present invention by the genetic recombination technique utilizing well-known hosts such as *Escherichia coli*, yeast, *Bacillus subtilis*, insect cell, and retrovirus. It was confirmed that peptides according to the present invention are recognized by cytotoxic T lymphocytes as a simple protein, and the glycosylation of a protein is not needed, so that a host can be easily selected considering only the productivity in the production by the genetic recombination technique.

For transformation a well-known method is applicable, for example, using plasmid, chromosome, virus, and so on as a replicon transformation of a host can be carried out. As a more preferable system, the integration-into-a chromosome method can be used considering the stability of the gene. Simply, however, the autonomous replication system using a plasmid can be used. Vectors are selected considering the kind of the host selected, and consist of a gene sequence to be expressed and a gene which has a functional portion of replication and regulation. Promoter, ribosome-binding site, terminator, signal sequence, enhancer, and the like can be used in combination, wherein the combination is selected depending on whether the host is a prokaryote or eukaryote.

Transformants can be cultured under a well-known condition suitable for each host. The peptide is produced by the subcultivation or batch culture using the amount of the transformant in the medium or the physiological activity of the peptide to be expressed/produced, particularly the recognition property by the cytotoxic T lymphocyte as an index.

(Chemical synthesis)

The peptides according to the present invention can be produced also by the method known in the general peptide chemistry. "Peptide Synthesis, Maruzen, 1975" and "Peptide Synthesis, Interscience, New York 1996" can be exemplified, but known methods are widely available.

(Collecting peptide)

Peptides according to the present invention can be purified/collected by the combination of the gel filtration chromatography, the ion column chromatography, the affinity chromatography, and the like using the recognition property by cytotoxic T lymphocytes as an index, or by the fractionation based on their solubility using ammonium sulfate, alcohol, and the like. A method to specifically adsorb/collect a peptide by a polyclonal antibody or monoclonal antibody, that is prepared against the peptide, is more preferably used.

(Antibody)

Antibodies that immunologically recognize peptides according to the

present invention can be prepared by well-known methods of antibody preparation, for example, by administration of a peptide according to the present invention to an animal in the presence or absence of an adjuvant with or without linking to a carrier so as to induce the immune response such as humoral response and/or cellular response. Any carrier can be used as long as it is not harmful to the host, such as cellulose, polymerized amino acid, and albumin. As an immunized animal, a mouse, rat, rabbit, goat, horse, and so on, is preferably used.

Polyclonal antibodies can be obtained from the serum of an animal immunized by peptides according to the present invention by well-known methods, preferably, such as immunoaffinity chromatography.

Monoclonal antibodies are produced by collecting antibody-producing cells from the above-mentioned immunized animal, followed by introducing a well-known transformation means with cells which can proliferate infinitely.

Thus obtained polyclonal antibodies or monoclonal antibodies can be utilized as antibodies for purifying peptides according to the present invention, or as reagents, labelling markers, and so on.

(Screening)

Peptides according to the present invention, polynucleotides encoding the peptides and complementary strands thereto, cells transformed based on the information concerning these amino acid sequences and nucleotide sequences, and antibodies immunologically

recognizing peptides according to the present invention, or a combination of these provide an effective means for screening for a compound capable of inducing or activating cytotoxic T lymphocytes. The screening method can be constructed utilizing a well-known screening system for medical compounds. Compounds obtained by the screening method according to the present invention are also objects of the present invention. Such compounds can be compounds enhancing the recognition properties of peptides according to the present invention by HLA-A2402-restricted and/or HLA-A2-restricted CTLs, compounds enhancing the expression by the interaction with polynucleotides according to the present invention, compounds capable of inducing or activating cytotoxic T lymphocytes in a manner similar to peptides according to the present invention, or compounds enhancing the induction or activation of CTLs by peptides according to the present invention.

(Pharmaceutical composition)

The present invention provides pharmaceutical compositions containing one or more of the following: peptides according to the present invention, polynucleotides encoding the peptides and complementary strands thereto, vectors prepared based on these amino acid sequences and nucleotide sequences, cells transformed by the vectors, antibodies immunologically recognizing peptides according to the present invention, compounds enhancing the recognition properties by HLA-A2402-restricted and/or HLA-A2-restricted CTLs of peptides according to the present

invention and/or compounds enhancing the expression by the interaction with polynucleotides according to the present invention that can be obtained by the screening method according to the present invention. Pharmaceutical compositions according to the present invention are useful for treating cancers.

For example, a pharmaceutical composition containing peptide(s) according to the present invention can be used, for example, as a cancer vaccine. In such a case, in order to activate the cell-mediated immunity, a peptide according to the present invention can be used in the presence or absence of an appropriate adjuvant with or without linking to a carrier. Any carrier can be used as long as it is not harmful to the human body, such as cellulose, polymerized amino acid, and albumin. The composition can be in an appropriate form by applying a well-known method for a peptide preparation. The dosage level depends on the recognition property by cytotoxic T lymphocytes, and is generally 0.01 mg to 100 mg/day/adult, preferably 0.1 mg to 10 mg/day/adult (as an amount of a substance having the activity). Such a dose can be administered once every several days or several months.

Alternately, an effective action of a cancer vaccine can be obtained also by collecting a mononuclear cell fraction from the peripheral blood of a patient, culturing the fraction with a peptide according to the present invention, followed by returning the mononuclear cell fraction containing CTLs induced back into the blood of the patient. Culture conditions such as the concentration of mononuclear cells and the concentration of the

peptide when they are cultured can be easily determined by common experiments. In addition, substances having an ability to lead the growth of lymphocytes, such as interleukin-2, can be added to the medium.

Polynucleotides encoding the peptides according to the present invention and complementary strands thereto are useful for the gene therapy of cancer. Both a method in which these DNAs are carried in a vector and directly introduced in vivo, and a method in which cells are collected from a donor, followed by introducing DNAs being carried in a vector in vitro, can be utilized. Among vectors such as retrovirus, adenovirus, and vaccinia virus, retrovirus-related ones are recommended. Needless to say, these viruses have a defect in replication. The amount of administration of a polynucleotide encoding a peptide according to the present invention can depend on the recognition property by the cytotoxic T lymphocyte, but is generally 0.1 µg to 100 mg/day/adult, preferably 1 µg to 50 mg/day/adult. This dose can be administered once every several days to several months.

(Method and reagent kit for diagnosis)

Peptides according to the present invention are useful as a method for diagnosing diseases that are related to the expression of the peptides (particularly digestive system cancer). The diagnosis is carried out by assaying the amount of a corresponding nucleic acid sequence utilizing the interaction/reactivity to the nucleic acid sequence encoding the peptide and/or determining tissue distribution of the peptide in an individual and/or

determining the presence and amount of the peptide in a specimen derived from an individual. Namely, a peptide according to the present invention is to be assayed as the diagnosis marker. The assay method can be base on well-known antigen-antibody reaction systems, enzyme reaction systems, PCR reaction systems, and so on. The present invention also includes a reagent kit used for the above-mentioned diagnosis method. The reagent kit according to the present invention can contain one or more of the followings according to the present invention: peptides, polynucleotides encoding the peptides, and/or antibodies recognizing the peptides.

EXAMPLES

The present invention may be illustrated in detail with the following examples, but is not limited thereto.

Example 1

(Identification of lck gene)

In order to obtain a tumor antigen capable of activating cytotoxic T lymphocytes, VA13 cells transfected with a total of 10^5 cDNA clones prepared from a cDNA library of KE4 tumor cell together with HLA-A2402 were used as a stimulator, and were co-cultured with CTLs to give a cDNA clone that activates CTLs. The activation of CTLs was assayed using the IFN- γ production as an indicator. This method permits identifying a gene encoding a tumor-rejecting antigen (J. Exp. Med. 187: 277-288, 1998).

Specifically, the CTLs used as the effector cells were

HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (KE4-CTL), which were established from an esophageal carcinoma patient (Int. J. Cancer, 81: 457-466, 1999). In addition, in order to obtain a tumor antigen, the poly(A)⁺RNA of the KE4 tumor cells was converted to cDNA, and ligated to SalI adaptor to insert into the expression vector pSV-SPORT-1 (GIBCO BRL). cDNA of HLA-A2402 or HLA-A0201 (control) was obtained by the reverse transcription-PCR (RT-PCR), and was cloned into the eukaryote expression vector pCR3 (Invitrogen). 200 ng of plasmid DNA pool or clones of the KE4 cDNA library and 200 ng of HLA-A2402 cDNA were mixed with 1 μ l of lipofectin in 70 μ l of OPTI-MEM (GIBCO BRL) for 15 min.

A 30 μ l of the mixture was then added to VA13 cells (2×10^4) and incubated for 5 h. Next, 200 μ l of RPMI-1640 medium containing 10% of FCS was added, and the mixture were cultured for 2 days followed by the addition of KE4-CTLS (10^4 cells/well). After an 18 h incubation, 100 μ l of the supernatant was collected to measure IFN- γ by an ELISA kit as described previously (J. Exp. Med. 187: 277-288, 1998).

As a result, one clone (clone 21) was found to activate HLA-A24-restricted KE4-CTLS (Fig. 1). The nucleotide sequence of this cDNA clone proved to be 1,750-bp-long, and to have a homology of 100% with that of the lck gene at position 283-2,032 that is corresponding to the amino acid sequence at position 31-506 of the Lck protein consisting of 509 amino acids. Namely, it was suggested that the protein encoded by the lck gene is a tumor antigen capable of activating CTLs in an

HLA-A2402-restricted manner.

In addition, the Lck protein is also proved to be a tumor antigen capable of activating not only HLA-A24-restricted CTLs, but also HLA-A2-restricted CTLs by using three HLA-A2-restricted CTLs, i.e., OK-CTL-e subline (HLA-A0207) that is a subline of CTL line (OK-CTL) established from a colon cancer patient (J. Immunol., 163: 4999-5004, 1999), and GK-CTL2-2-4 subline (HLA-A0206) and GK-CTL2-2-5 subline (HLA-A0206) that are two sublines of the CTL line (GK-CTL) established from a pulmonary cancer patient in place of HLA-A2402-restricted KE-CTL as an effector cell, and using VA13 cells transfected with the lck gene and HLA-A0201, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A2402, or HLA-A2601 as a stimulator [Figs.2 (A), (B) and (C)].

Example 2

(Expression of Lck protein)

The expression of Lcks (56kD and 59kD) at the protein level in various cells and tissues was investigated by Western blot analysis with a monoclonal anti-Lck antibody.

The examination was carried out for primary colon cancer (n=49), non-neoplastic colon (n=5), pulmonary cancer [adenocarcinoma: n=8, squamous cell carcinoma (SCC): n=8], and esophageal carcinoma cells. The colon cancer cell lines (COLO201, COLO205, COLO320, HCT116, and SW620), pulmonary cancer cell lines (LK87: adenocarcinoma cell, and LK79: small cell carcinoma), and esophageal carcinoma cell line (KE4) were

also examined.

Specimens were lysed with a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.2 mM PMSF (Sigma Chemical Co.), and 0.03 trypsin inhibitor unit/ml of aprotinin, sonicated, and centrifuged at 14,000 rpm for 20 min. The supernatant obtained was used as a cytosol fraction. The lysate was separated by 10% SDS-PAGE.

The proteins obtained in the acrylamide gel were blotted onto Hybond™-polyvinylidene difluoride membrane (Amersham) and were incubated with the monoclonal anti-Lck antibody (Santa Cruz) for 4 h at room temperature. The other methods of Western blot analysis were carried out according to the methods previously described (Int. J. Cancer, 54: 158-165, 1995).

Lck proteins were not detected in unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), but they did become detectable in a cytosol fraction of activated PBMCs (PHA-blast) after stimulation by 10 µg/ml phytohemagglutinin; PHA) for 48 h. Lck proteins were detected in all the malignant tumor cell lines tested, including SCC and adenocarcinoma cell lines, as well as in the majority of fresh tumor tissues obtained from various organs, including esophageal carcinoma, pulmonary SCC and pulmonary adenocarcinoma cells. In contrast, they were not detected at all in any of the non-tumorous colon tissues (Table 1).

Table 1

Species and source of cell	Expression of Lck protein	
	Cell line	Tissue
Normal cell		
Peripheral blood mononuclear cell	2/2	-
PHAblast	2/2	-
COS-7/VA13	0/2	-
Non-tumorous part of colon tissue	-	4/6
Non-tumorous part of esophageal tissue	-	4/6
Non-tumorous part of uterine tissue	-	4/6
Cancer cell		
Colon cancer	7/7	38/49
Esophageal cancer	6/14	5/9
Pulmonary cancer	4/17	4/10
Gastric cancer	2/8	ND
Uterine cancer	5/7	55/64
Ovarian cancer	0/12	ND
Hepatic cell cancer	0/13	ND
Osteosarcoma	0/16	ND
Primary cerebral tumor	0/16	5/24
Metastatic cerebral tumor	-	6/6

ND: not determined.

Example 3

(Tumor antigen peptide recognized by HLA-A24-restricted CTL)

In order to specify the tumor antigen peptide capable of binding to the HLA-A24 molecule, which is derived from Lck, thirteen different peptides were synthesized and loaded onto C1R/A2402 so as to test the ability of enhancing the IFN- γ production by KE4-CTLs.

With respect to peptides derived from Lck capable of binding to the HLA-A2402 molecule, peptides for HLA-A24-binding motif were search for in the literature, and thirteen peptides were synthesized based on the sequence of the lck gene product consisting of 509 amino acids (Nature, 319: 682-685, 1986), although some amino acids of some peptides were modified. The synthesized peptides are summarized in Table 2.

Table 2

Lck peptide	Amino acid sequence										
39·48 :	R	N	G	S	E	Y	R	D	P	L	
71·80 :	S	Y	E	P	S	H	D	G	D	L	
114·122 :	N	F	V	A	K	A	N	S	L		
162·170 :	S	F	S	L	S	V	R	D	F		
191·199 :	F	Y	I	S	P	R	I	T	F		
208·216 :	H	Y	T	N	A	S	D	G	L		
303·312 :	L	Y	A	V	V	T	Q	E	P	I	
317·325 :	E	Y	M	E	N	G	S	L	V		
353·361 :	A	F	I	E	E	R	N	Y	I		
393·402 :	E	Y	T	A	R	E	G	A	K	F	
445·453 :	T	N	P	E	V	I	Q	N	L		
486·494 :	T	F	D	Y	L	R	S	V	L		
488·497 :	D	Y	L	R	S	V	L	E	D	F	

In order to specify the tumor antigen, C1R/A2402 (2×10^4) cells transfected with HLA-A2402 were pulsed with a peptide at a final concentration of 10 μM for 2 h. KE4-CTLs (1×10^4) were then added, and incubated for 18 h. 100 μl of the supernatant was collected to measure IFN- γ by ELISA.

Among 13 peptides synthesized, 6 peptides [Lck71·80, Lck208·216 (SEQ ID NO:3), Lck317·325, Lck353·361, Lck486·494 (SEQ ID NO:1), or Lck488·497 (SEQ ID NO:2)] had an activity of enhancing the IFN- γ

production in CTLs (Fig. 3), and 3 peptides [Lck208-216 (SEQ ID NO:3), and Lck486-494 (SEQ ID NO:1), Lck488-497 (SEQ ID NO:2)] showed a strong activity. The activity of Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) peptide to enhance the IFN- γ production by CTLs proved to be dose-dependent, and was detected at 1 nM or so. On the other hand, the activity of Lck208-216 (SEQ ID NO:3) was detected at 100 nM or higher (Fig. 4).

Similar results were obtained also in the case where VA13 cells (2×10^4) were used in place of C1R/A2402 cells, which were pulsed with these peptides after transfecting with HLA-A2402 to use as a stimulator.

When anti-CD3 (NuT3), anti-CD4 (NuTh/s), anti-CD8 (NuTc/i), anti-CD13 (MCS-2), anti-MHC class I (W6/32) or anti-MHC class II (HDR1) antibody (Int. J. Cancer, 58: 317-323, 1994) was used in the above-mentioned CTL activation test, IFN- γ production by KE4-CTL in the reaction against C1R/A2402 cells pulsed with each of three peptides was inhibited by anti-CD3, anti-CD8 and anti-MHC class I monoclonal antibody, but not by anti-CD4, anti-MHC class II and anti-CD13 monoclonal antibody [Fig. 5(A), (B) and (C)]. Therefore, it was confirmed that the KE4-CTL has the phenotype of CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD4 $^-$, and is a cytotoxic T lymphocyte that recognizes MHC class I.

In addition, in order to confirm peptide specificity in CTLs, sublines of KE4-CTL were established from the parental HLA-A2402-restricted KE4-CTL by the limiting dilution culture (J. Exp. Med. 187: 277-288, 1998). With respect to 20 different KE4-CTL sublines obtained having the

phenotype of CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻, the reactivity against each of the above-mentioned three peptides was tested.

As a result, two sublines (sublines #49 and #93) recognized Lck488-497 (SEQ ID NO:2), and one clone (clone #80) recognized Lck486-494 (SEQ ID NO:1) [Figs.6(B), (C) and (D)]. Subline #19 recognized both Lck208-216 (SEQ ID NO:3) and Lck486-494 (SEQ ID NO:1) [Fig. 6(A)]. Sixteen other sublines did not recognize any of these peptides. This result suggests that CTLs may be a population comprising cells that recognize a plural number of tumor antigens.

Example 4

(Induction of HLA-A24-restricted cytotoxic T cell by peptide)

Activities of three peptides [Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), and Lck488-497 (SEQ ID NO:2)] were tested with respect to inducing HLA-A24-restricted CTLs against tumor cell lines (KE4, W620 and COLO201) that is expressing Lck protein, from PBMCs obtained from a colon cancer patient.

PBMCs (2x10⁶) of an HLA-A24⁺ patient or healthy donor were incubated with 10 µM of peptide in each well of a 24-well plate containing 2 ml of a culture medium (45% RPMI-1640 medium, 45%AIM-V ® medium/GIBCO BRL, and 10% FCS with 100U/ml of IL-2 and 0.1 mM MEM non-essential amino acid solution/GIBCO BRL).

At days 7 and 14 of culture, cells were collected, washed, and stimulated with autologous PBMCs or dendritic cells that were irradiated

(50 Gray) and pulsed with the peptide as antigen-presenting cells (APCs). The dendritic cells were induced by incubating PBMCs (2×10^6 cell/well) in RPMI1640 (GIBCO BRL) containing 10%FCS and 100U/ml IL-4 and 100U/ml GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) for 7 days.

The cells collected at day 21 were immediately tested by the ELISA method on the reactivity as the effector to various target cells by using the ability of IFN- γ production as an index. The result is illustrated in Fig. 7. PBMCs stimulated in vitro three times with Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), or Lck488-497 (SEQ ID NO:2), particularly PBMCs stimulated with Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) produced a greater amount of IFN- γ in the reaction to an HLA-A24 $^+$ tumor cell (KE4 and SW620) than in the reaction to an HLA-A24 $^-$ tumor cell (COLO201). On the other hand, PBMCs obtained from a healthy donor did not exhibit an HLA-A24-restricted CTL activity even if stimulated with any of the three peptides pulsed using irradiated PBMCs for antigen-presenting cells (APCs). PBMCs obtained from a healthy donor exhibited an HLA-A24-restricted CTL activity when stimulated using dendritic cells (DCs) pulsed with the peptide as APCs (Table 3).

Table 3

Donor	Antigen-presenting cell	Peptide	Amount of interferon- γ production by recognition of cancer cell line (pg/ml)		
			KE4 (A24 $^{+}$)	SW620 (A24 $^{+}$)	COLO201 (A24 $^{-}$)
Colon cancer patient	Autologous peripheral blood mononuclear cell	None	1079	902	194
		Lck208-216	1479	1113	188
		Lck486-494	1857	1724	289
		Lck488-497	2527	2140	424
Healthy donor 1	Autologous dendritic cell	None	230	380	54
		Lck208-216	570	786	124
		Lck486-494	1105	2061	177
		Lck488-497	621	966	122
Healthy donor 2	Autologous peripheral blood mononuclear cell	None	101	187	0
		Lck208-216	82	128	1
		Lck486-494	41	94	10
		Lck488-497	90	140	6

In addition, for the test of ^{51}Cr release from target cells, the above-mentioned PBMCs that were stimulated three times with a peptide were further co-cultured with feeder cells consisting of irradiated HLA-A24 $^{+}$ allogenic PBMCs (2×10^5 cells/well) that had been pulsed with a corresponding peptide. At around day 24 of the re-culture, the cytotoxic T lymphocyte activity of these cells was confirmed by the assay of the IFN- γ production, and these cells were directly tested for their cytotoxicity by a 6h ^{51}Cr -release test at a various effector/target ratio. PBMCs stimulated with each of the above-mentioned three peptides derived from Lck lysed HLA-A24 $^{+}$ KE tumor cells and SW620 tumor cells, but did not lyse either HLA-A24 $^{+}$ PHA-activated T lymphocytes from a healthy donor or HLA-A24 $^{-}$ COLO201 tumor cells. Results with Lck488-497 are illustrated in Fig. 8(A), and those with Lck208-216 in Fig. 8(B). Thus, a peptide derived from

Lck proved to be able to induce HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.

Example 5

(Induction of HLA-A24-restricted CTL in peripheral blood mononuclear cells obtained from a cancer patient)

With respect to three peptides [Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), and Lck488-497 (SEQ ID NO:2)], the activity of inducing HLA-A24-restricted CTL against Lck-expressing tumor cell lines (KE4, SW620 and COLO201) from PBMCs obtained from a cancer patient was assayed using the amount of INF- γ production as an indicator. The method for inducing CTLs and the method for assaying IFN- γ were similar to those used in Example 4.

As a result, as shown in Table 4, CTLs were induced by Lck208-216 (SEQ ID NO:3) and Lck488-497 (SEQ ID NO:2) from PBMCs of a colon cancer patient and an esophageal cancer patient.

Table 4

Case	Age	Sex	Cancer species	Presence or absence of metastasis	CTL induction by Lck peptide			
					No peptide	Lck 208- 216	Lck 486- 494	Lck 488- 497
N.I.	51	Male	Colon	+	-	+	-	+
Y.K.	73	Female	Esophageal	+	Not determined	+	-	+

Next, PBMCs (2×10^6) of the colon cancer patient were previously stimulated by adding three peptides, i.e., Lck208-216 (SEQ ID NO:3), Lck486-494 (SEQ ID NO:1), or Lck488-497 (SEQ ID NO:2), and further cultured after adding to HLA-A24⁺ C1R/A2402 cells incubated with 10 µg/ml of each peptide for antigen-presenting, and the amount of INF- γ produced in the culture supernatant was assayed. As shown in Figs.9(A), (B), (C) and (D), PBMCs of a colon cancer patient that had been previously stimulated with Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) reacted only to peptides presented by antigen-presenting cells, i.e., Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) respectively to produce IFN- γ , i.e., to induce CTLs. Namely, Lck486-494 (SEQ ID NO:1) or Lck488-497 (SEQ ID NO:2) proved to be able to induce peptide-specific CTLs from PBMCs of a colon cancer patient by the pre-stimulation. On the other hand, when PBMCs of a colon cancer patient were previously stimulated by Lck208-216 (SEQ ID NO:3), or in the absence of the peptide, peptide-specific CTLs could not be induced.

Then, in order to examine the properties of CTLs induced from the colon cancer patient, using the SW620 cell as a target cell, 10 µg/ml of anti-CD4 (NuTh/s), anti-CD-8 (NuTc/i), anti-CD14, anti-MHC class I (W6/32) or anti-MHC class II (HDR1) antibody and 10 µg/ml of Lck488-497 (SEQ ID NO:2) were added, followed by incubation with CTLs induced from the colon cancer patient and the amount of INF- γ produced in the supernatant was determined (Fig. 10). As a result, the production of INF- γ from CTLs was inhibited by anti-CD8 and anti-MHC class I monoclonal

antibody. Therefore, CTLs induced from a colon cancer patient were confirmed to be cytotoxic T lymphocytes that have the phenotype CD8⁺ CD4⁻ and recognize MHC class I.

CTL precursor cells in PBMCs of the above-mentioned colon cancer patient were examined. SW620 cells were placed in a 96-well plate for incubation, and 1-100 CTL(s) of the above-mentioned colon cancer patient that had been previously stimulated by Lck488-497 (SEQ ID NO:2) was/were added to each well for further incubation, and a well was determined in which SW620 cells that are target cells survived. As a control, CTLs of the above-mentioned colon cancer patient that was not stimulated with the peptide were used. Results are illustrated in Fig. 11. The frequency of CTL precursor cells in PBMCs of the colon cancer patient was 1/634 when not stimulated with the peptide, but was 1/81 when stimulated with Lck488-497 (SEQ ID NO:2). Therefore, it was confirmed that the number of CTL precursor cells is increased by stimulation with the peptide.

Example 6

(Examination of peptide having HLA-A24-restricted CTL-inducing property)

Thus, three peptides derived from Lck, i.e., Lck208-216 (SEQ ID NO:3) (HYTNASDGL), Lck486-494 (SEQ ID NO:1) (TFDYLRSVL) and Lck488-497 (SEQ ID NO:2) (DYLRSVLEDF) were found to be able to induce CTLs that recognize HLA-A24⁺ tumor cell line. These results

suggest that the amino acid sequence DYLRSV, which is the overlapping region for the two peptides Lck486-494 (SEQ ID NO:1) and Lck488-497 (SEQ ID NO:2), is recognized as a tumor antigen epitope by CTLs induced by the peptide, and that this part included in the kinase domain of Lck protein has a relevance to tumor rejection. With attention to this amino acid sequence DYLRSV, peptides that are homologous to this sequence were searched for, so that such peptides were found to be included in the amino acid sequence of some tyrosine kinases (Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930, 1985) which are belonging to the Src family as well as Lck, as shown in Table 5.

Table 5

488-497															
Lck	486-498	:	T	F	D	Y	L	R	S	V	L	E	D	F	F
486-494															
Src	511-523	:	T	F	E	Y	L	Q	A	F	L	E	D	Y	F
Yes	508-520	:	T	F	E	Y	I	Q	S	F	L	E	D	Y	F
Fgr	504-516	:	T	F	E	Y	L	Q	S	F	L	E	D	F	F
Fyn	512-524	:	T	F	E	Y	L	Q	S	F	L	E	D	Y	F
Lyn	489-501	:	T	F	D	Y	L	Q	S	V	L	D	D	F	Y
Hck	503-515	:	T	F	E	Y	I	Q	S	V	L	D	D	F	Y
Blk	482-494	:	T	F	E	F	L	Q	S	V	L	E	D	F	Y

Based on these amino acid sequences of the peptides derived from Src family, Src511-519 (SEQ ID NO:4) (TFEYLQAFL), Yes508-516 (SEQ ID NO:5) (TFEYIQSFL), Fyn512-520 (SEQ ID NO:6) (TFEYLQSFL), Lyn489-497 (SEQ ID NO:7) (TFDYLQSVL), Hck503-511 (SEQ ID NO:8) (TFEYIQSVL), and Blk482-490 (SEQ ID NO:9) (TFEFLQSVL) were synthesized, and 10 µg/ml of each peptide was incubated with SW620 cells used as target cells, and then KE4-CTL cells used in Examples 1 and 2 were added and then cultured to assay a CTL-inducing activity using the amount of IFN- γ produced in the culture supernatant as the indicator. In addition, KE4 as a positive control was used for the target cell. Other methods were similar to those used in Example 4. As shown in Fig. 12, each peptide derived from the Src family showed a CTL-inducing ability comparable or greater to the peptide derived from Lck.

Example 7

(Induction of CTL by peptide derived from Src family in a cancer patient)

With respect to Lck486-494 (SEQ ID NO:1) (TFDYLRSVL), Src511-519 (SEQ ID NO:4) (TFEYLQAFL), Yes508-516 (SEQ ID NO:5) (TFEYIQSFL), Fyn512-520 (SEQ ID NO:6) (TFEYLQSFL), Lyn489-497 (SEQ ID NO:7) (TFDYLQSVL), Hck503-511 (SEQ ID NO:8) (TFEYIQSVL), and Blk482-490 (SEQ ID NO:9) (TFEFLQSVL), induction of HLA-A24-restricted CTLs from PBMCs obtained from a metastatic cancer patient was examined. The induction of CTLs and the assay of CTL activity were carried out in manners similar to those used in Example 4,

and KE4 cells (HLA-A2402/26), SW620 cells (HLA-A0201/24), COLO201 cells (HLA-A0101/0201), and VA13 cells (HLA-A02) were used as target cells. CTLs were induced in PBMCs by Lck486-494 (SEQ ID NO:1) in 4 cases among 7 cases of cancer patients, by Src511-519 (SEQ ID NO:4) in 2 cases among 3 cases, by Yes508-516 (SEQ ID NO:5) in 1 case among 3 cases, by Fyn512-520 (SEQ ID NO:6) in 1 case among 2 cases, by Hck503-511 (SEQ ID NO:8) in 2 cases among 2 cases, and by Blk482-490 (SEQ ID NO:9) in 1 case among 2 cases. However, CTLs were not induced by Lyn489-497 in each of 2 cases tested.

Example 8

(Tumor antigen peptide recognized by HLA-A2-restricted CTL)

In order to specify an HLA-A2 molecule-binding tumor antigen peptide derived from Lck, 24 different peptides were synthesized to introduce into VA13 (HLA-A02), and an ability of enhancing INF- γ production by OK-CTL or GK-CTL subline (2-2-4) was tested in a manner similar to one used in Example 3.

Peptides derived from Lck capable of binding to the HLA-A2 molecule were prepared by searching for peptides for HLA-A2-binding motif, followed by synthesizing 24 different peptides based on the sequence of the lck gene product consisting of 509 amino acids (Nature, 319: 682-685, 1986). Synthesized peptides are summarized in Tables 6 and 7.

Table 6

HLA-A0201-binding motif of peptides derived from Lck

340-348 :	K	L	L	D	M	A	A	Q	I
185-193 :	N	L	D	N	G	G	F	Y	I
36-44 :	L	L	I	R	N	G	S	E	V
387-395 :	R	L	I	E	D	N	E	Y	T
347-355 :	Q	I	A	E	G	M	A	F	I
492-500 :	S	V	L	E	D	F	F	T	A
299-307 :	R	L	V	R	L	Y	A	V	V
493-501 :	V	L	E	D	F	F	T	A	T
246-254 :	K	L	V	E	R	L	G	A	A
279-287 :	S	M	S	P	D	A	F	L	A
293-301 :	K	Q	L	Q	H	Q	R	L	V
151-159 :	F	L	I	R	E	S	E	S	T
35-44 :	R	L	L	I	R	N	G	S	E
201-210 :	G	L	H	E	L	V	R	H	Y
231-240 :	K	P	W	W	E	D	E	W	E
379-388 :	K	I	A	D	F	G	L	A	R
294-303 :	Q	L	Q	H	Q	R	L	V	R
335-344 :	K	L	T	T	N	K	L	L	D
110-119 :	F	I	P	F	N	F	V	A	K
250-259 :	R	L	G	A	A	Q	F	G	E

Table 7

HLA-A0206-binding motif of peptides derived from Lck

61-69	:	L	Q	D	N	L	V	I	A	L
239-247	:	E	V	P	R	E	T	L	K	L
422-430	:	D	V	W	S	F	G	I	L	L
27-36	:	I	V	R	L	D	G	K	D	R

In order to specify the tumor antigen peptide, 2×10^4 of VA13 cells transfected with HLA-A2 were pulsed with the peptide at a final concentration of $10 \mu\text{M}$ for 2 h. 1×10^4 of KE4-CTLs were then added and incubated for 18 h. $100 \mu\text{l}$ of the supernatant was collected to measure IFN- γ by ELISA.

Among these peptides, seven peptides [Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), Lck294-303 (SEQ ID NO:13), Lck340-348 (SEQ ID NO:14), Lck347-355 (SEQ ID NO:15), Lck422-430 (SEQ ID NO:16), or Lck492-500 (SEQ ID NO:17)] enhanced the production of IFN- γ by OK-CTL subline and GK-CTL subline (2-2-4) [Fig. 13(A) and (B)]. When a similar experiment was carried out at various concentrations of the peptide to pulse, Lck61-69 (SEQ ID NO:11) activated particularly OK-CTL subline, and Lck246-254 (SEQ ID NO:12) activated particularly GK-CTL subline (2-2-4), and Lck422-430 (SEQ ID NO:16) activated particularly GK-CTL subline (2-2-5), in a dose-dependent manner, to enhance the production of IFN- γ from these CTLs [Figs. 14(A), (B), and (C)].

Example 9

(Induction of HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte by peptide)

With respect to three peptides [Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), or Lck422-430 (SEQ ID NO:16)], the activity was examined of inducing HLA-A2-restricted CTLs against tumor cell lines Panc-1, SW620, COLO320 and VA13 from PBMCs obtained from a metastatic colon cancer patient.

Using PBMCs of a metastatic HLA-A2⁺ colon cancer patient, the induction of CTLs and the assay of IFN- γ were carried out in manners similar to those used in Example 4 [Figs. 15(A) and (C)]. In addition, the cytotoxic activity of the CTLs was directly assayed by the ^{51}Cr -release test [Figs. 15(B) and (D)]. Lck246-254 (SEQ ID NO:12) and Lck422-430 (SEQ ID NO:16) induced HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs from PBMCs obtained from a metastatic HLA-A2⁺ colon cancer patient.

Example 10

(Induction of HLA-A2-restricted CTL in a cancer patient)

The ability of three peptides [Lck61-69 (SEQ ID NO:11), Lck246-254 (SEQ ID NO:12), or Lck422-430 (SEQ ID NO:16)] to induce HLA-A2-restricted CTLs from PBMCs obtained from various cancer patients was studied. The induction of CTLs and the assay of CTL activity were carried out in manners similar to those used in Example 4, using SW620 cells (HLA-A0201/24) as target cells. CTLs were induced in PBMCs by Lck246-254 (SEQ ID NO:12, 2 cases among 6 cases) and

Lck422-430 (SEQ ID NO:16, 3 cases among 6 cases) (Table 8).

Table 8

Case	Age	Sex	Cancer species	Stage	Meta stasis	CTL induction by Lck peptide			
						No peptide	Lck 246-254	Lck 61-69	Lck 422-430
1	53	Female	Colon cancer	IV	+	-	+	-	-
2	72	Female	Colon cancer	IV	+	-	+	-	+
3	57	Female	Colon cancer	IIIa	+	-	-	-	-
4	76	Male	Pulmonary cancer	III	+	-	-	-	+
5	50	Male	Esophageal cancer	IV	+	-	-	-	+
6	73	Male	Gastric cancer	I	-	-	-	-	-

INDUSTRIAL APPLICABILITY

Peptides derived from Lck and peptides derived from the Src family, according to the present invention, are tumor antigen peptides, and can induce HLA-A24-restricted and/or HLA-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from PBMCs of a cancer patient. Lck proteins are expressed in a majority of cancer tissues including large intestine, lung and esophagus. Namely, tumor antigen peptides according to the present invention can be used for the specific immunotherapy for cancer. In addition, the HLA-A24 allele is detected in approximately 60% of the Japanese population (in a majority, equal to 95%, the genotype is A2402), 20% of Caucasians, and 12% of Africans. The HLA-A2 allele is detected in

approximately 40% of Japanese, 53% of Chinese, 49% of North Caucasians, 38% of South Caucasians, and 23% of Black Africans. Therefore, the specific immunotherapy using tumor antigen peptides according to the present invention can be used in many cancer patients. A peptide provided by the present invention, a polynucleotide encoding the peptide, and an antibody recognizing the peptide provide extremely useful means in the field of the treatment and diagnosis of cancers.

FREE TEXT IN SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:10 :

<220>

<230> Designed peptide based on amino acid sequence of Src family tyrosine kinases, which peptide has an ability to generate HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes

<222> (3)

<230> Xaa can be Asp or Glu.

<222> (4)

<230> Xaa can be Tyr or Phe.

<222> (5)

<230> Xaa can be Leu or Ile.

<222> (6)

<230> Xaa can be Arg or Gln.

<222> (7)

<230> Xaa can be Ser or Ala.

<222> (8)

<230> Xaa can be Val or Phe.

<222> (10)

<230> Xaa can be Glu or Asp.

<222> (12)

<230> Xaa can be Phe or Tyr.

<222> (13)

<230> Xaa can be Phe or Tyr.

What is claimed is:

1. A peptide having an amino acid sequence SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17 in the sequence listing.

2. A peptide having an amino acid sequence SEQ ID NO:10 in the sequence listing, comprising:

Thr-Phe-Xaa-Xbb-Xcc-Xdd-Xee-Xff-Leu-Xgg-Asp-Xhh-Xii, wherein Xaa is Asp or Glu, Xbb is Tyr or Phe, Xcc is Leu or Ile, Xdd is Arg or Gln, Xee is Ser or Ala, Xff is Val or Phe, Xgg is Glu or Asp, Xhh is Phe or Tyr, and Xii is Phe or Tyr.

3. An inducer of cytotoxic T lymphocytes, wherein the inducer comprises at least the peptide according to claim 1 or 2.

4. A method for inducing cytotoxic T lymphocytes using the peptide according to claim 1 or 2.

5. A cancer vaccine comprising of at least the peptide according to claim 1 or 2.

6. A polynucleotide encoding the peptide according to claim 1 or 2, or its complementary strand.

7. A polynucleotide that hybridizes with the polynucleotide or its complementary strand according to claim 6 under a stringent condition.
8. A recombinant vector comprising the polynucleotide or its complementary strand according to claim 6 or 7.
9. A transformant transformed with the recombinant vector according to claim 8.
10. A method for producing a peptide, which comprises the step of culturing the transformant according to claim 9.
11. An antibody that immunologically recognizes the peptide according to claim 1 or 2.
12. A method for screening a compound that interacts with the peptide according to claim 1 or 2 and enhances the recognition property by at least HLA-A2402-restricted and/or HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes, and/or a compound that interacts with the polynucleotide according to claim 6 or 7 and enhances the expression, wherein the method uses at least one selected from the group consisting of the peptide according to claim 1 or 2, the polynucleotide according to claim 6 or 7, the recombinant vector according to claim 8, the transformant according to claim 9, and the antibody according to claim 11.

13. A compound obtained by the screening method according to claim 12.
14. A pharmaceutical composition comprising, in an amount effective for the cancer treatment, at least one selected from the group consisting of the peptide according to claim 1 or 2, the polynucleotide according to claim 6 or 7, the recombinant vector according to claim 8, the transformant according to claim 9, the antibody according to claim 11, and the compound according to claim 13.
15. A method for treating cancer comprising applying to a patient the inducer of cytotoxic T lymphocytes according to claim 3, the cancer vaccine according to claim 5, or the pharmaceutical composition according to claim 14.
16. A method for diagnosing a disease relevant to the expression or activity of the peptide according to claim 1 or 2, wherein the method comprises the step of analyzing, as a marker, (a) a polynucleotide encoding the polypeptide and/or (b) the peptide in a specimen derived from an individual.
17. A reagent kit used for the method according to claim 16, wherein the reagent kit includes one or more selected from the group consisting of

the peptides according to claims 1 and 2, the polynucleotides according to claims 6 and 7, and the antibody according to claim 11.

ABSTRACT

A tumor antigen peptide capable of inducing and/or activating HLA-A24-restricted and/or HLA-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes functions by providing a polynucleotide encoding the peptide and a complementary strand thereto, a recombinant vector containing the polynucleotide, a transformant containing the recombinant vector, a method for producing the peptide, an antibody against the peptide, a compound interacting with these entities and a method for screening for the compound, a pharmaceutical composition utilizing these entities, and a means for the diagnosis utilizing these entities.

DRAWINGS

Fig.1

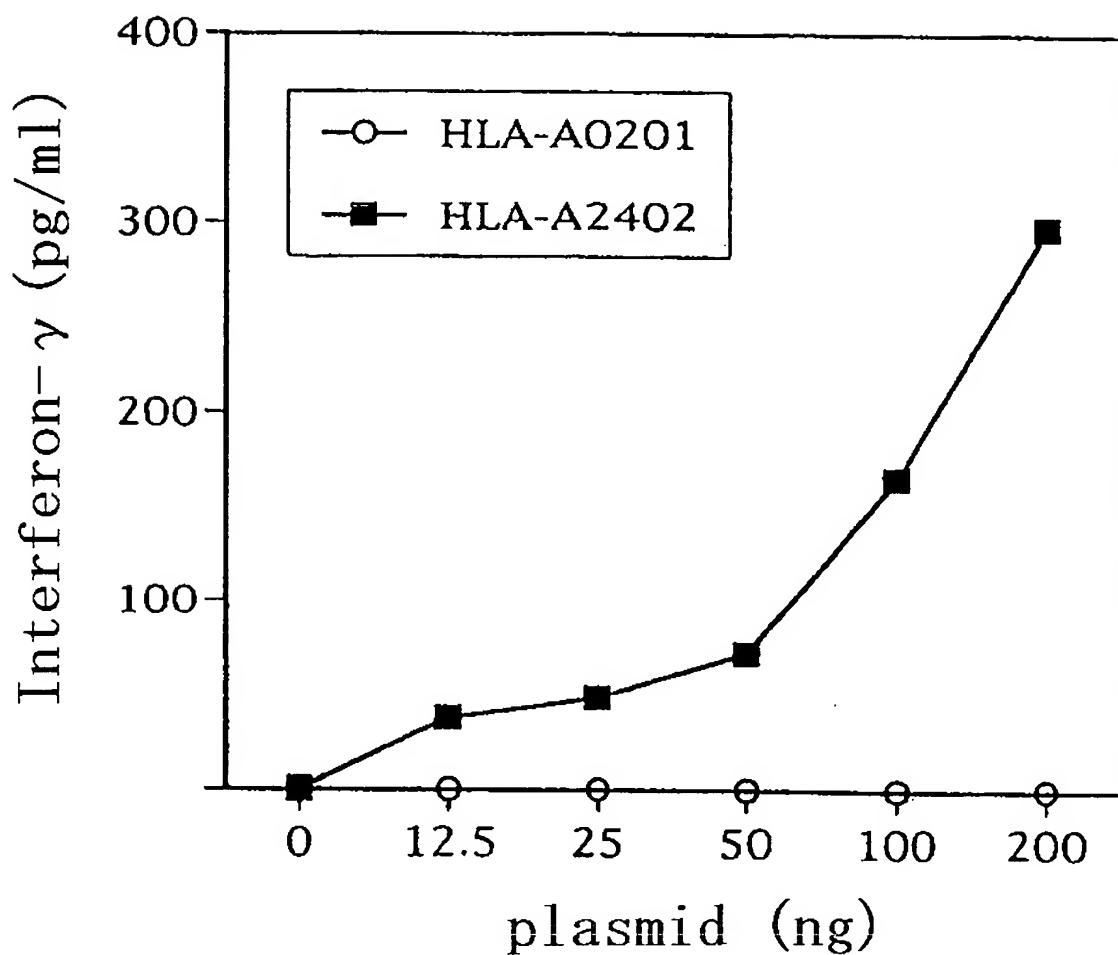


Fig.2

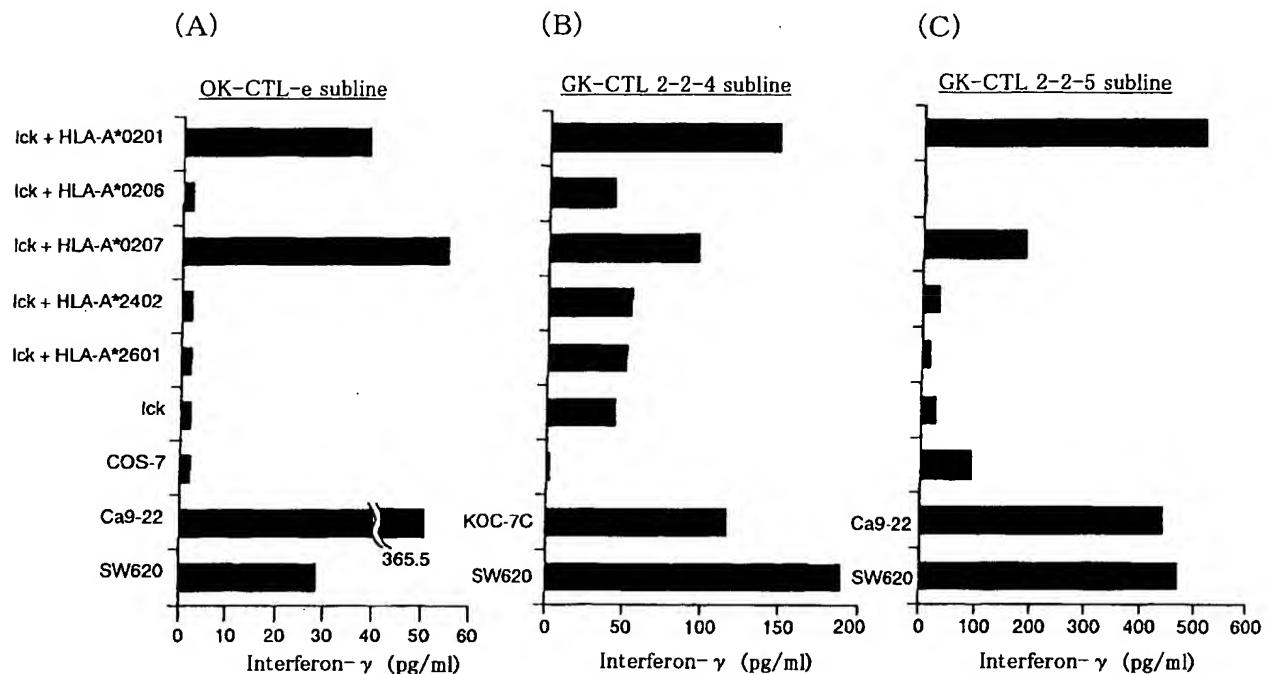


Fig.3

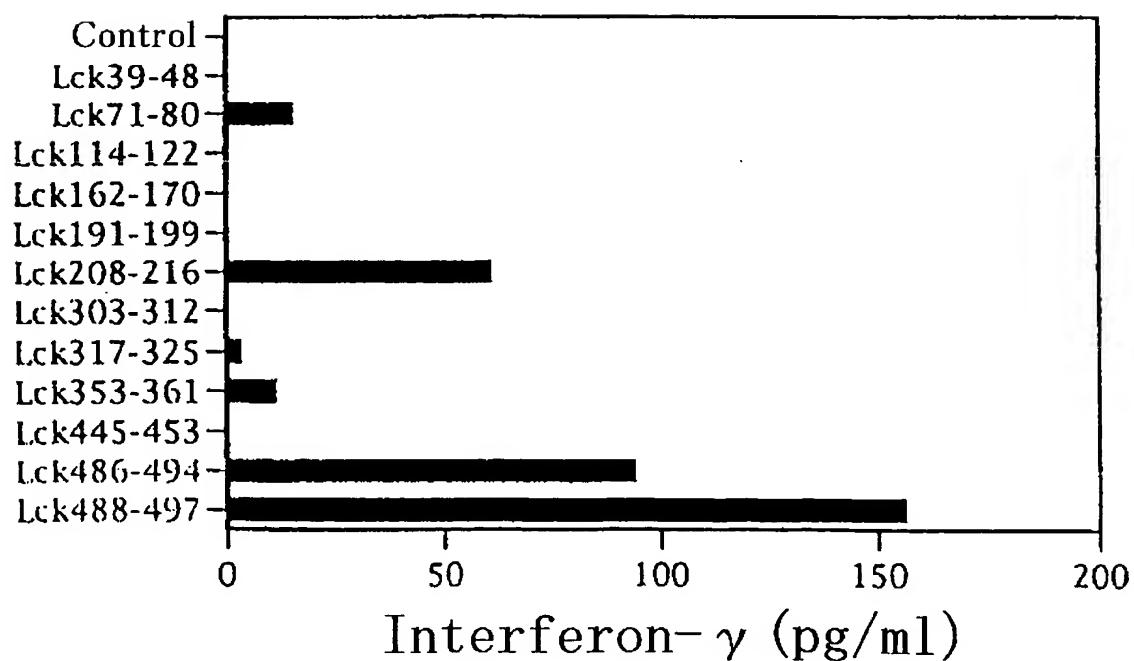


Fig4

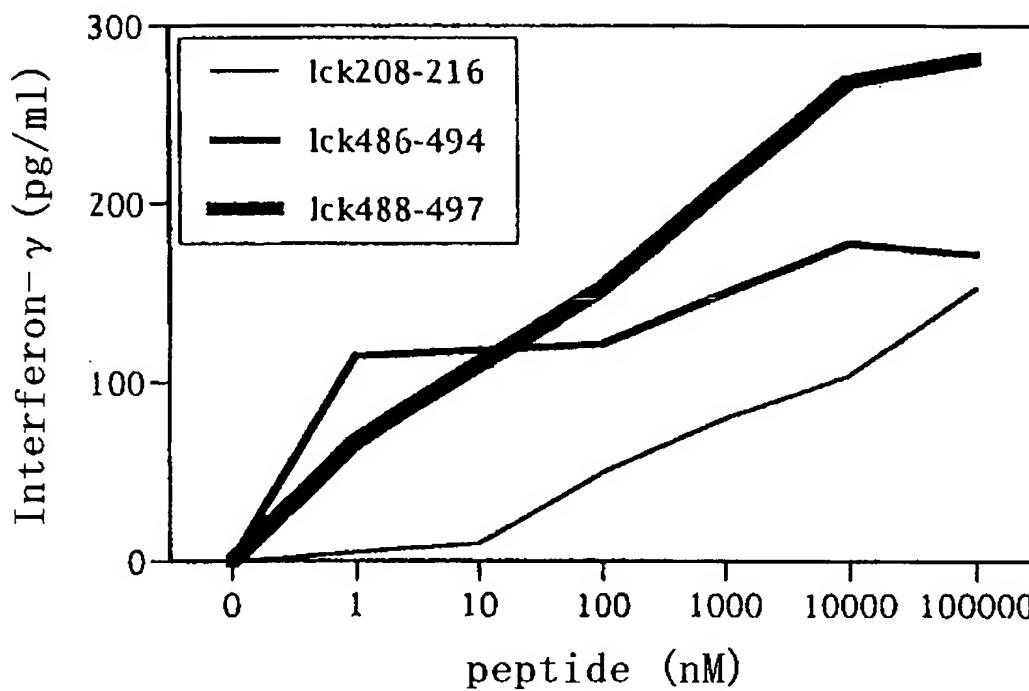


Fig.5

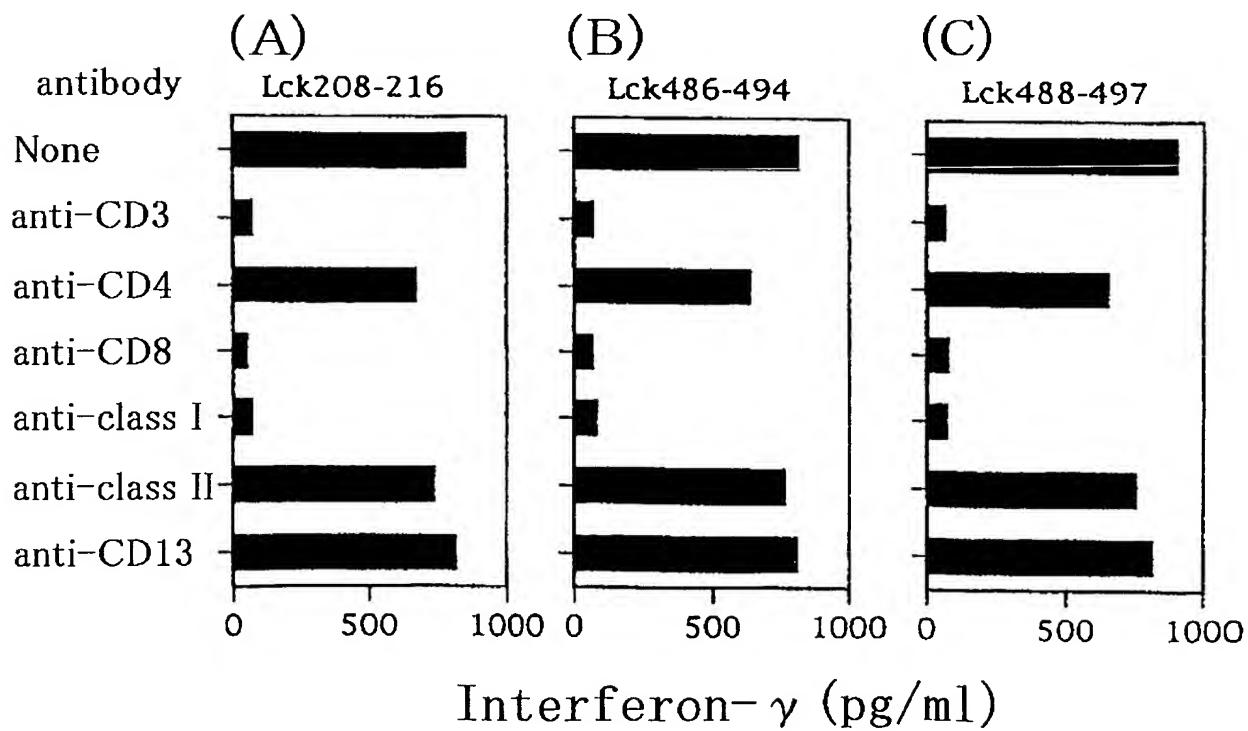


Fig.6

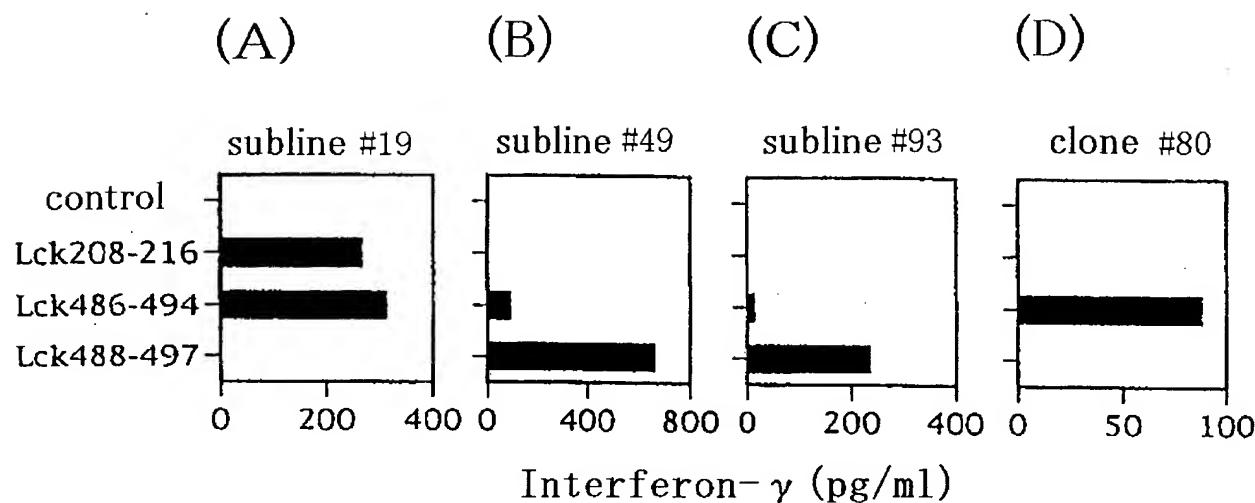


Fig.7

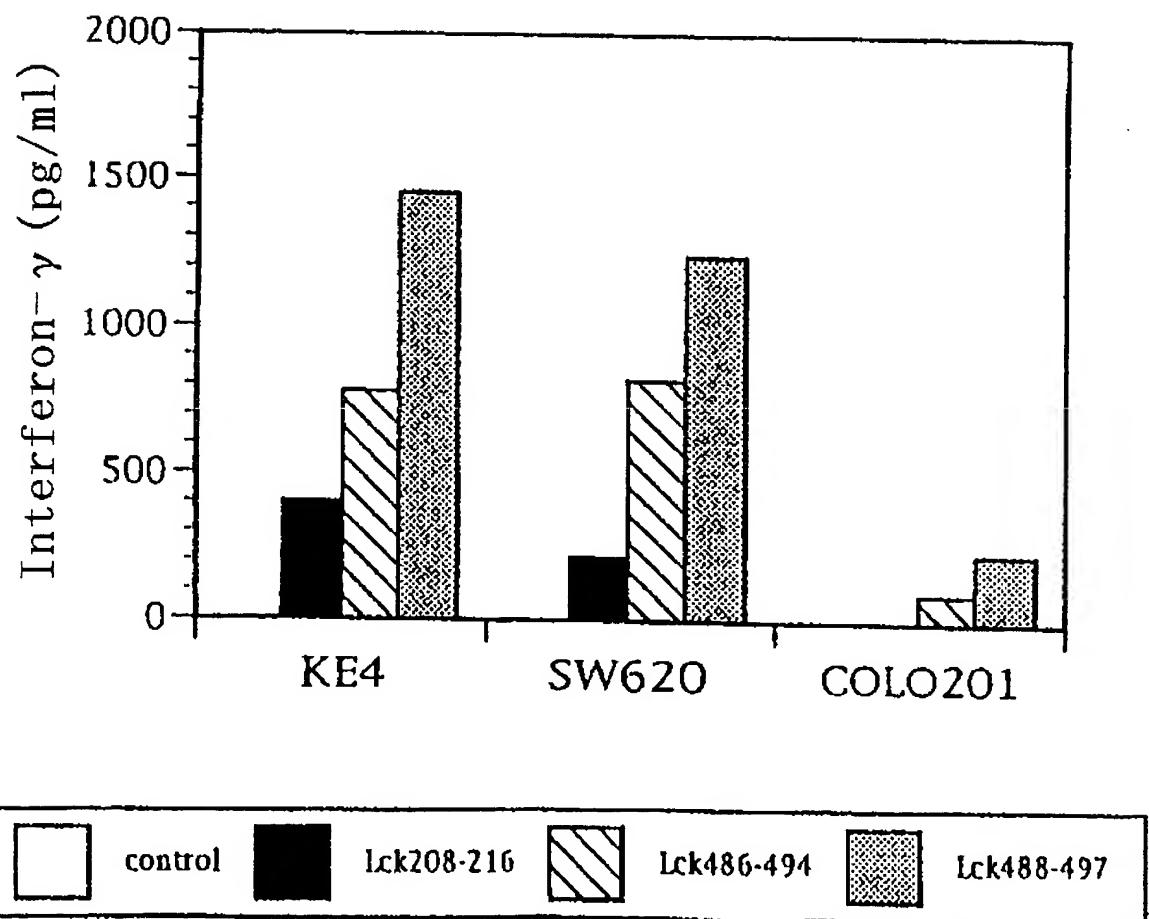
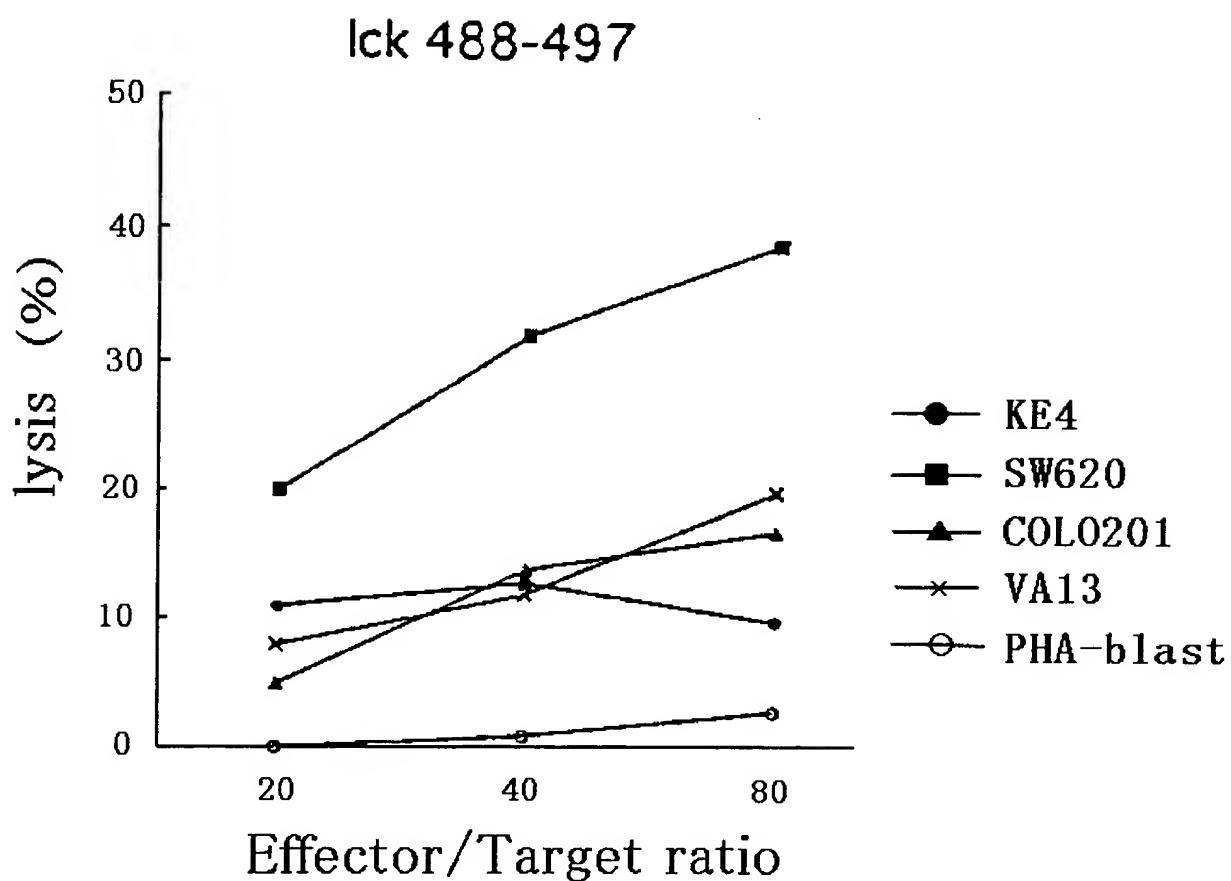


Fig.8

(A)



(B)

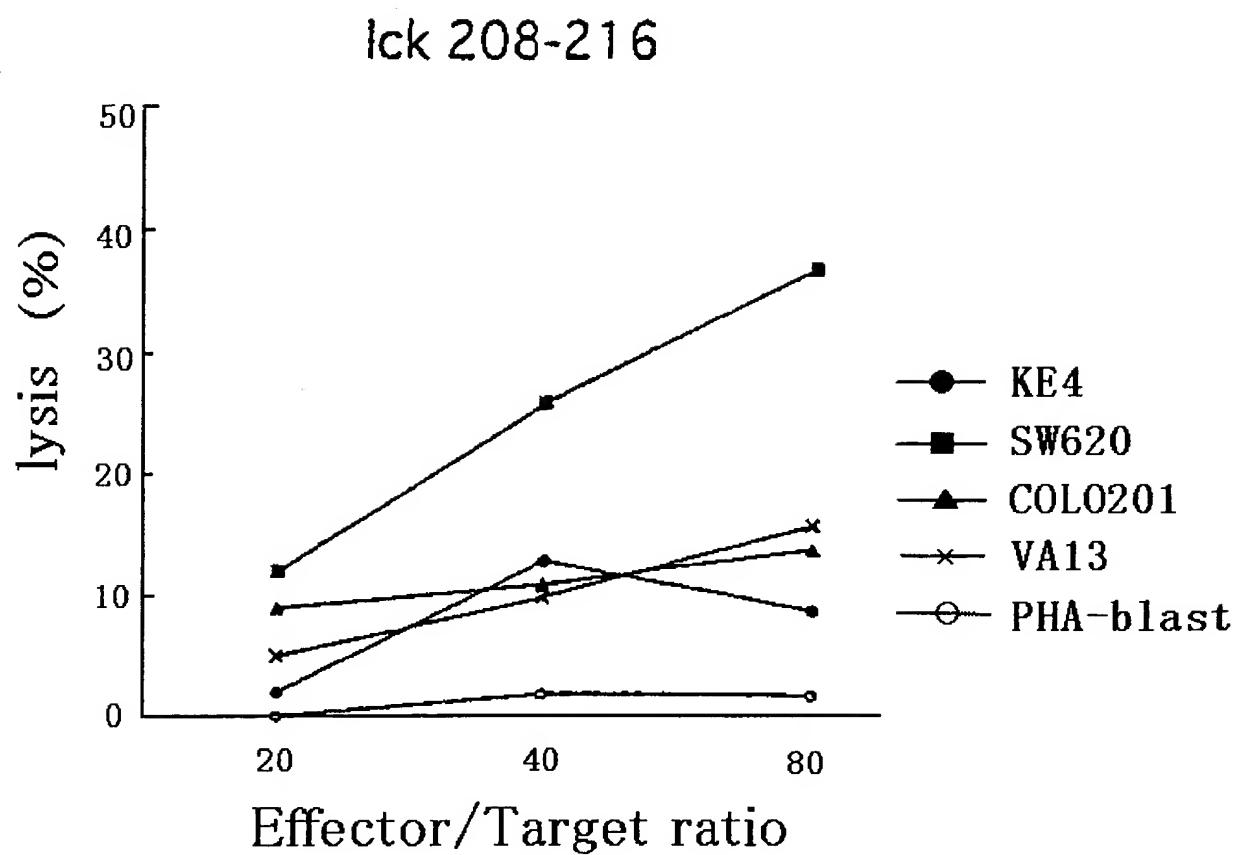


Fig.9

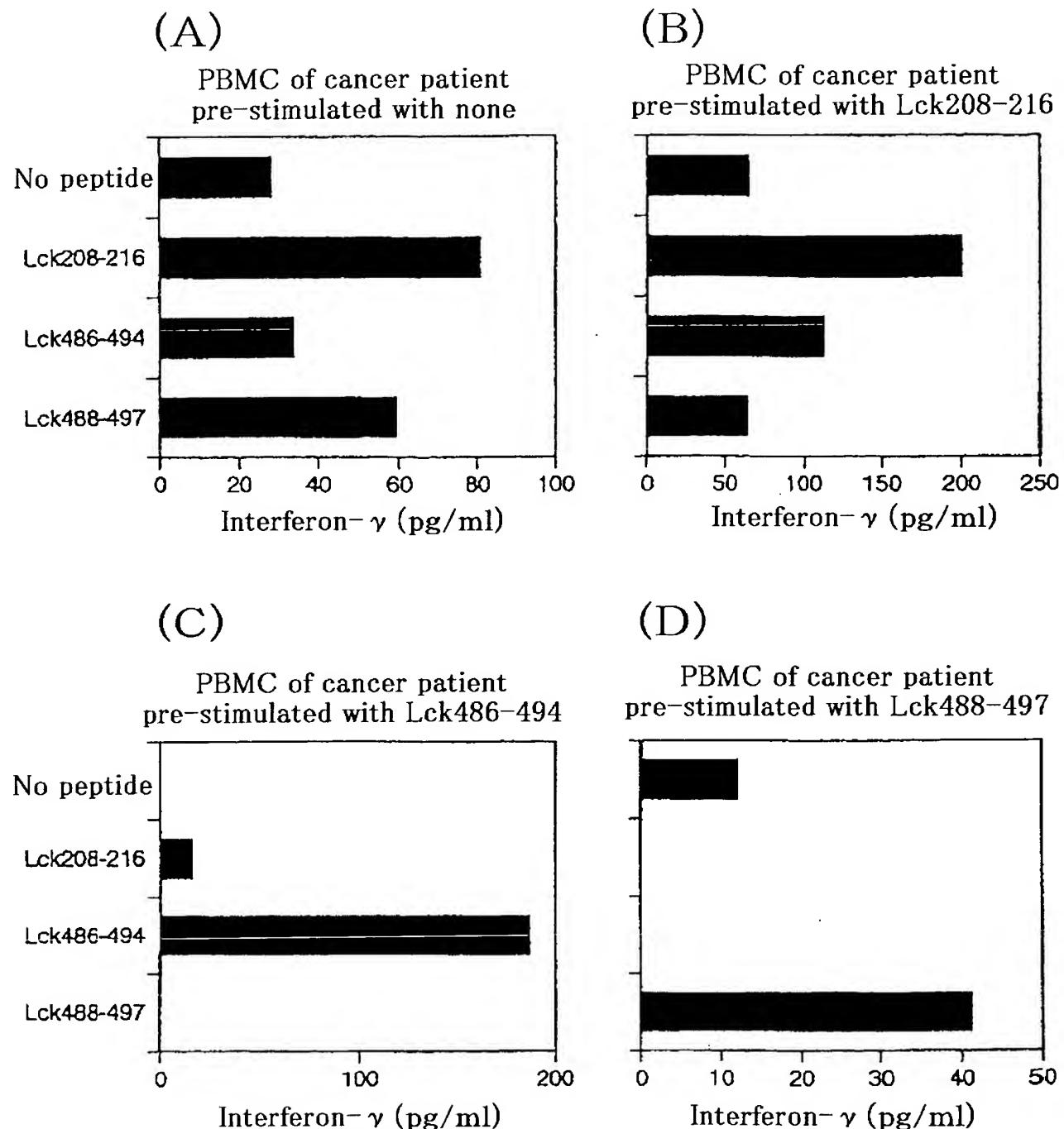


Fig.10

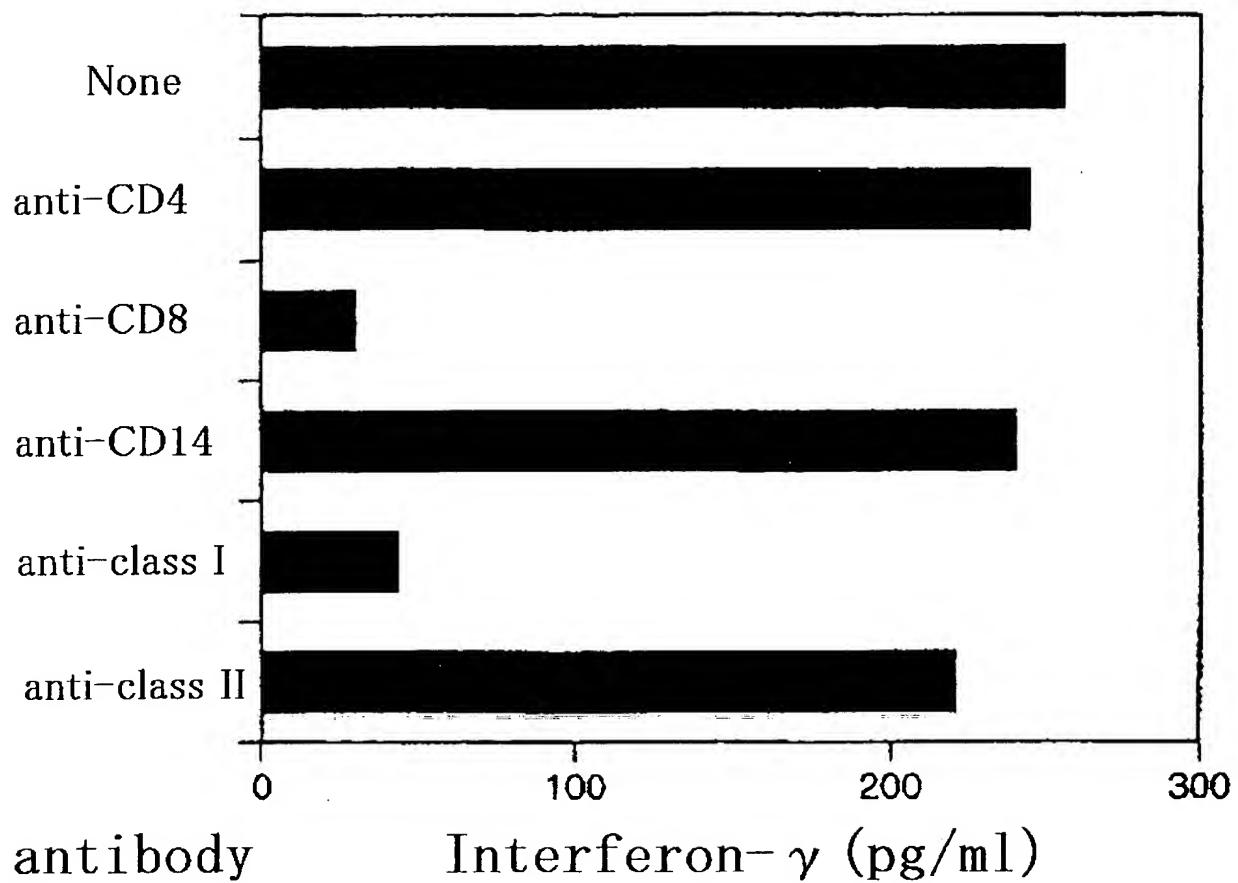


Fig.11

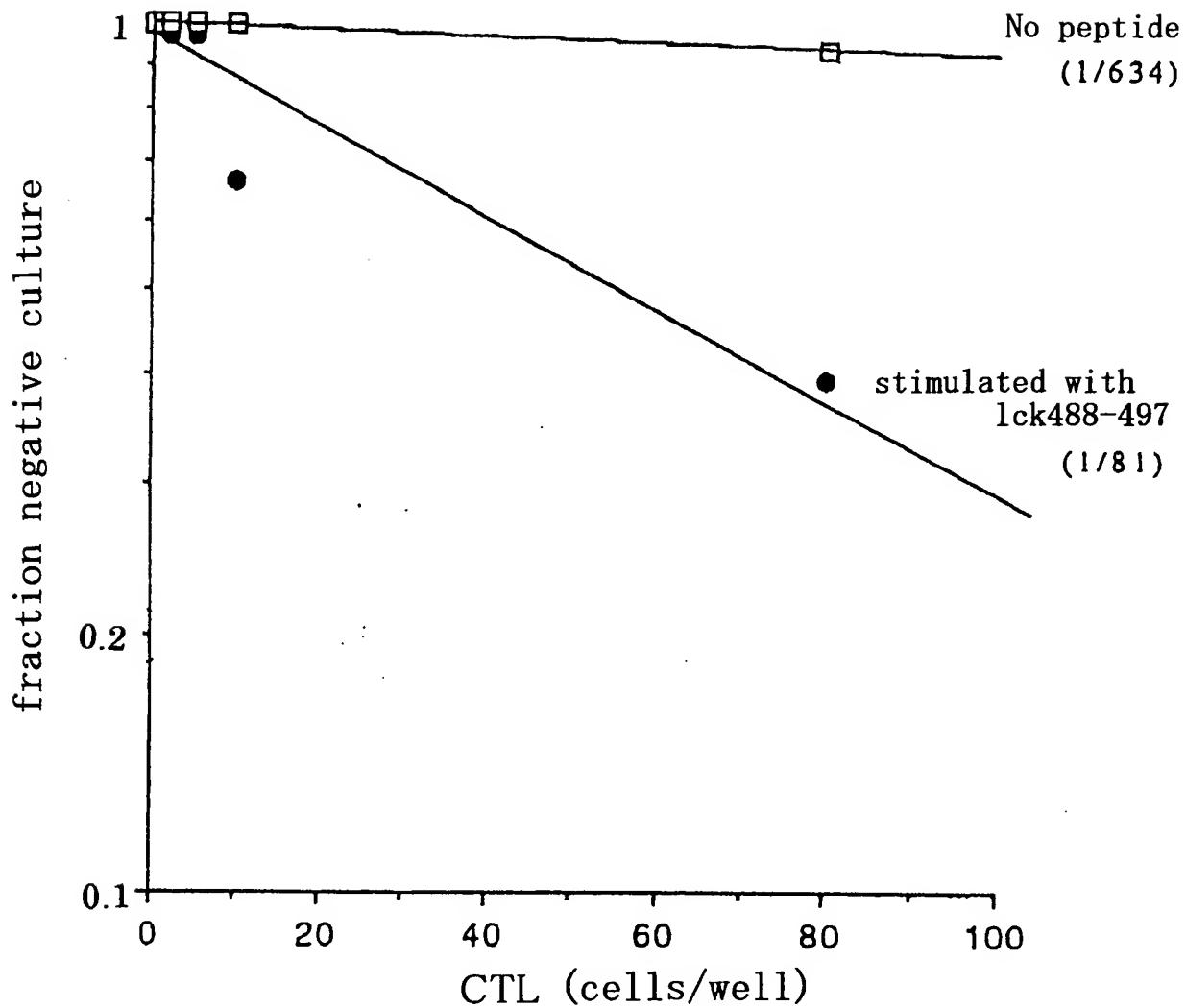


Fig.12

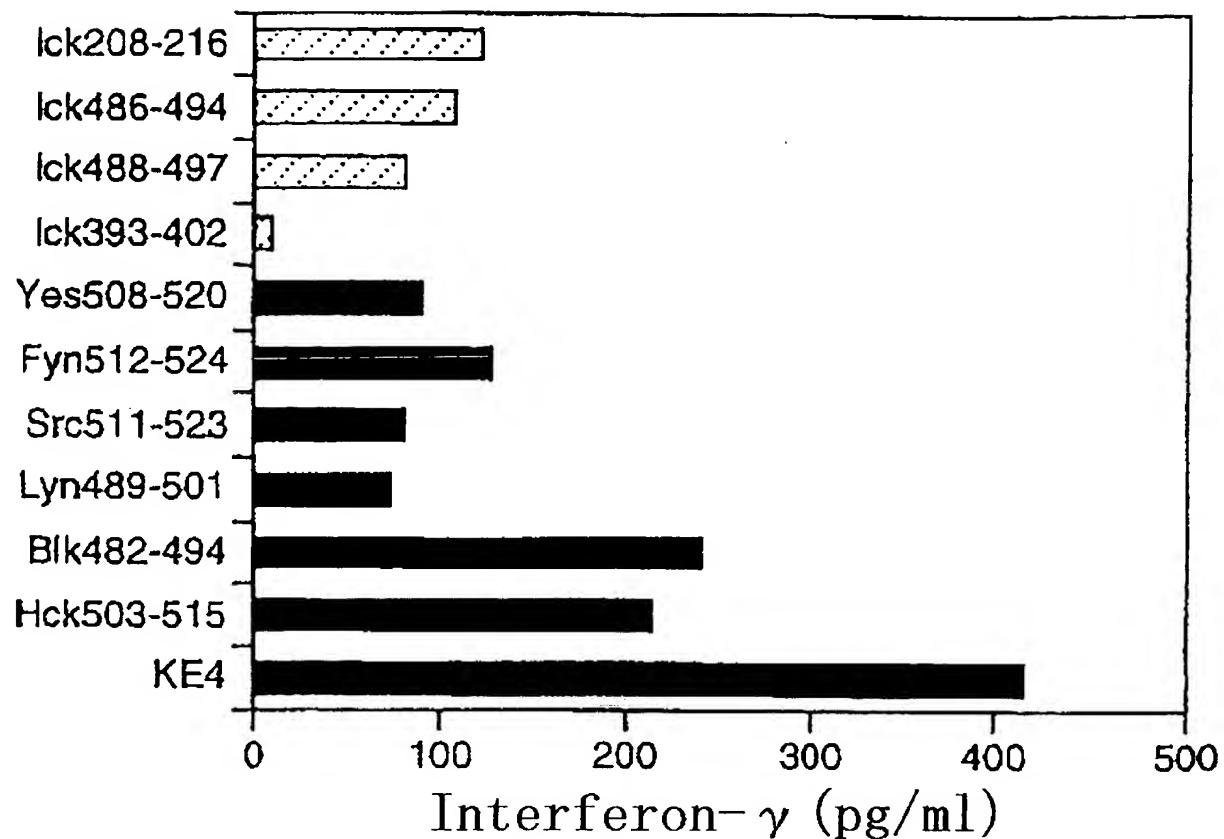


Fig.13

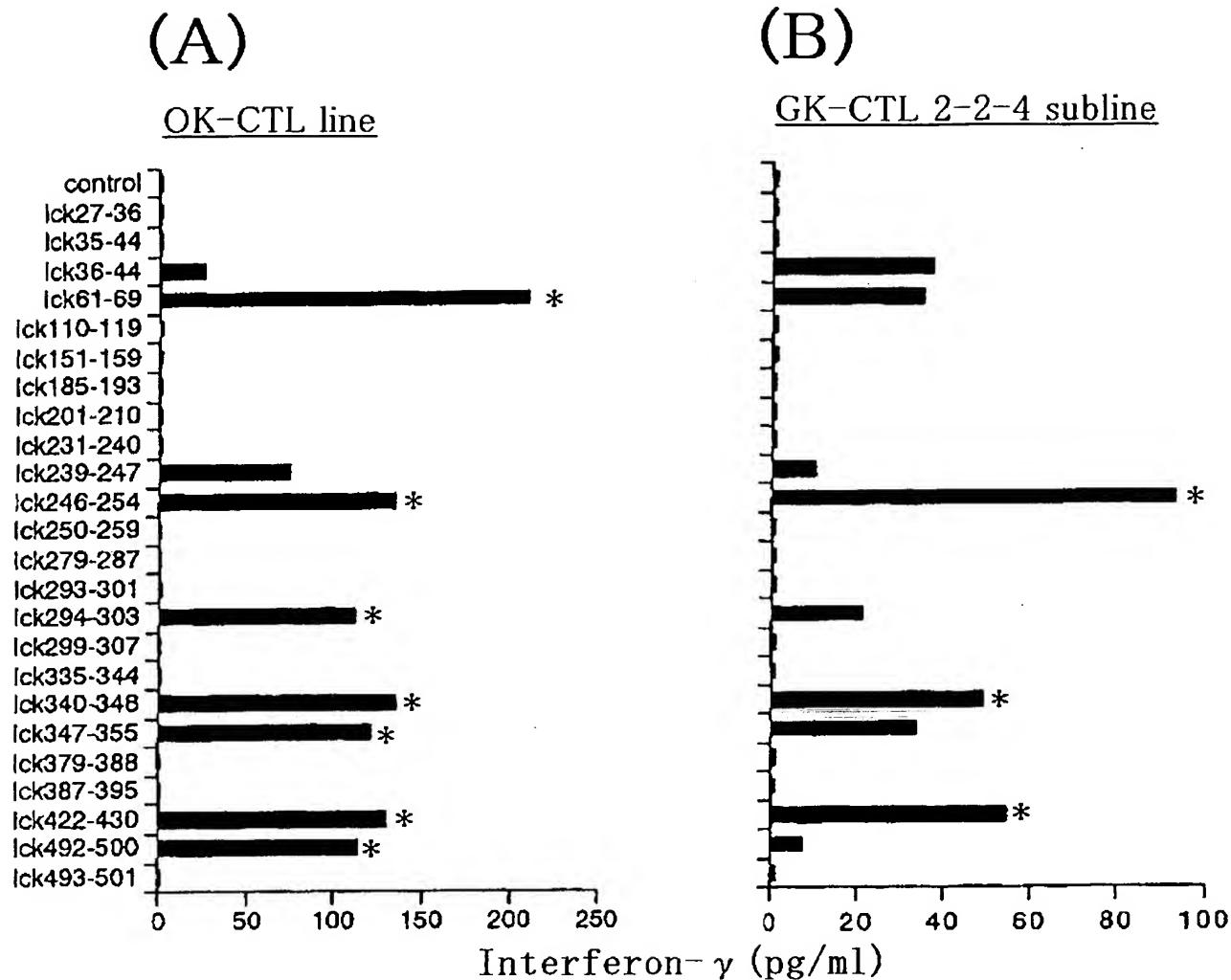
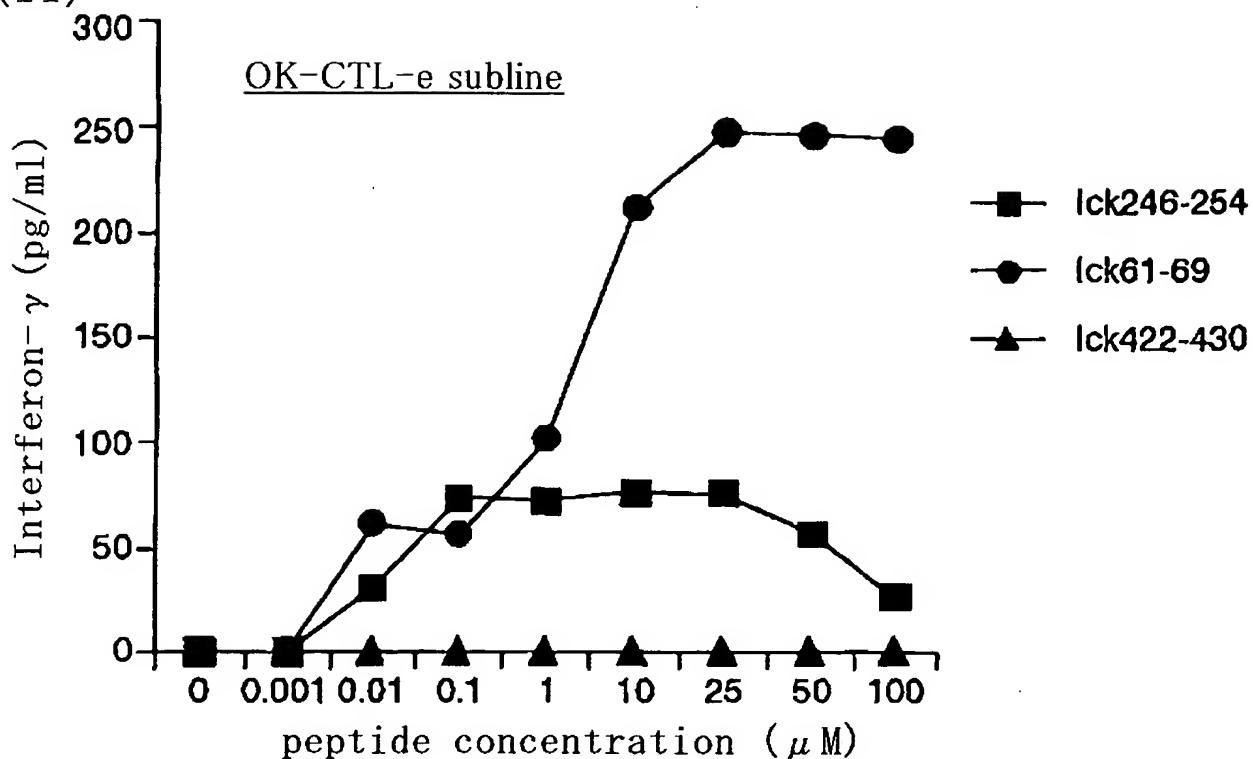
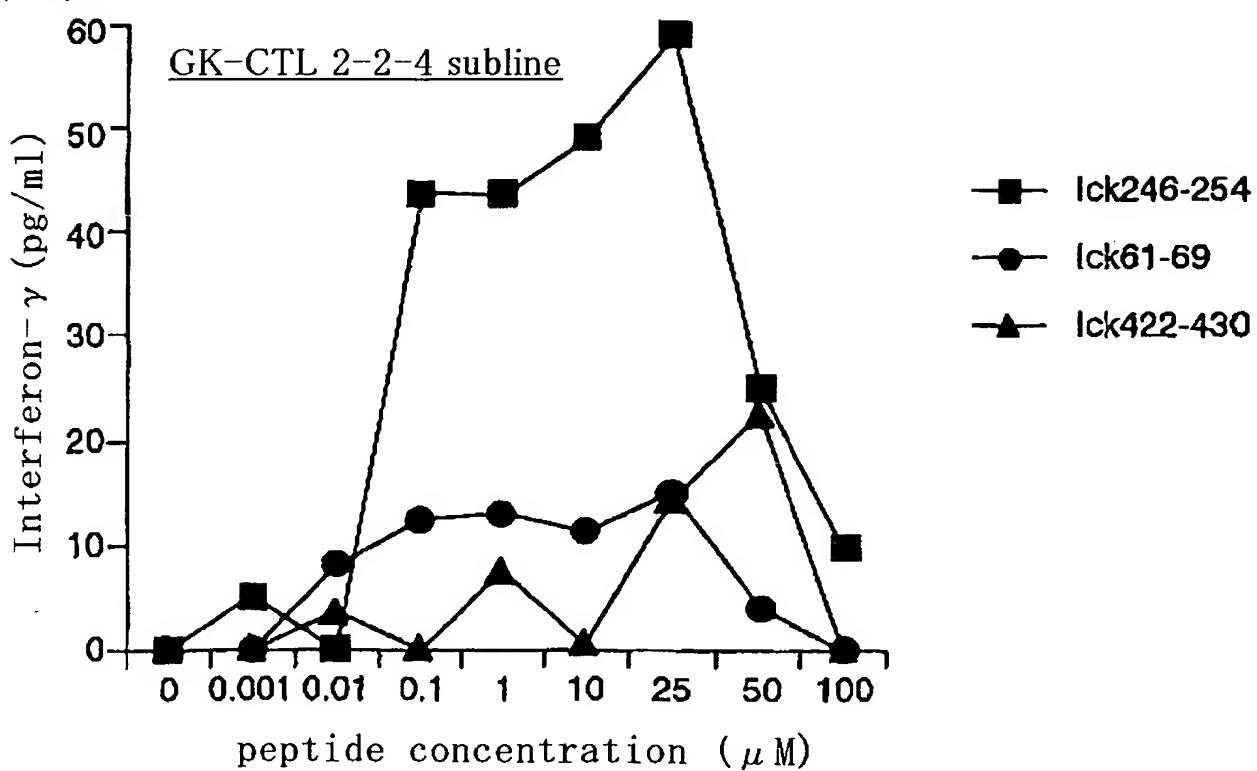


Fig.14

(A)



(B)



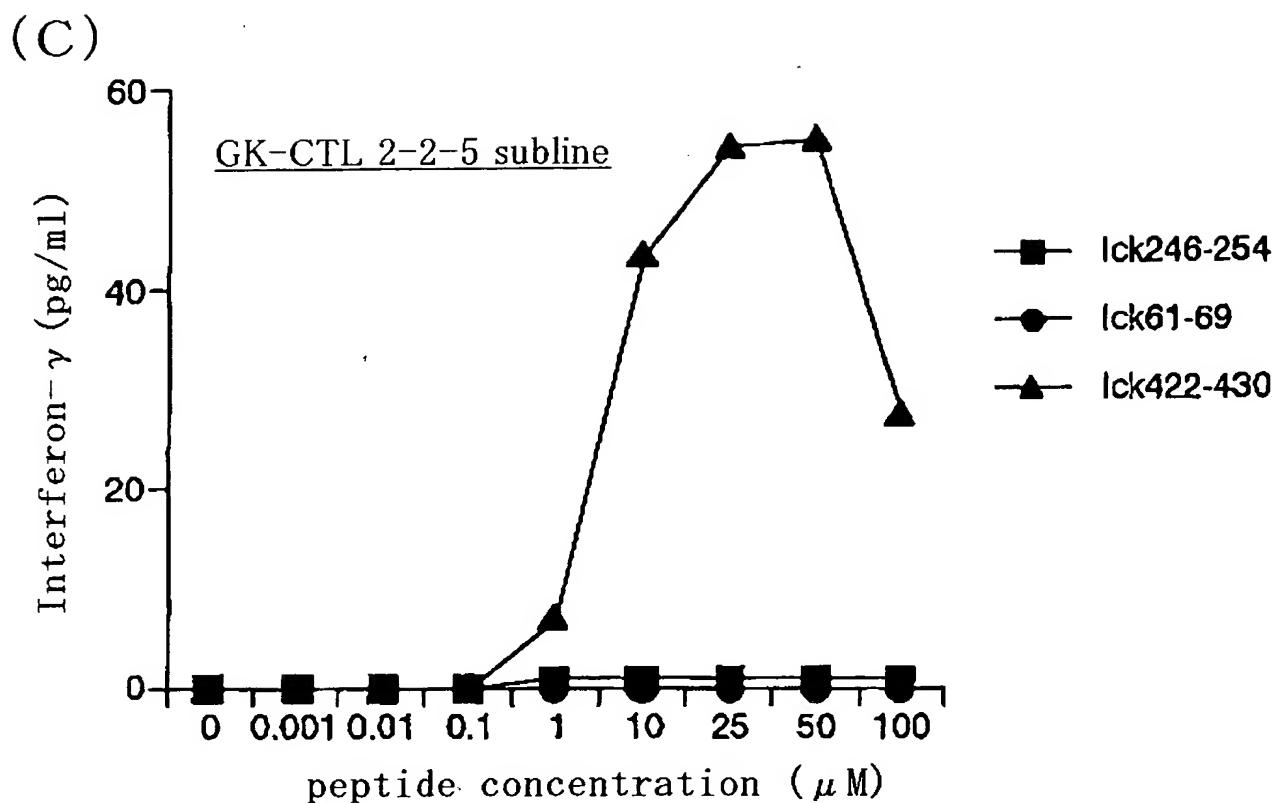
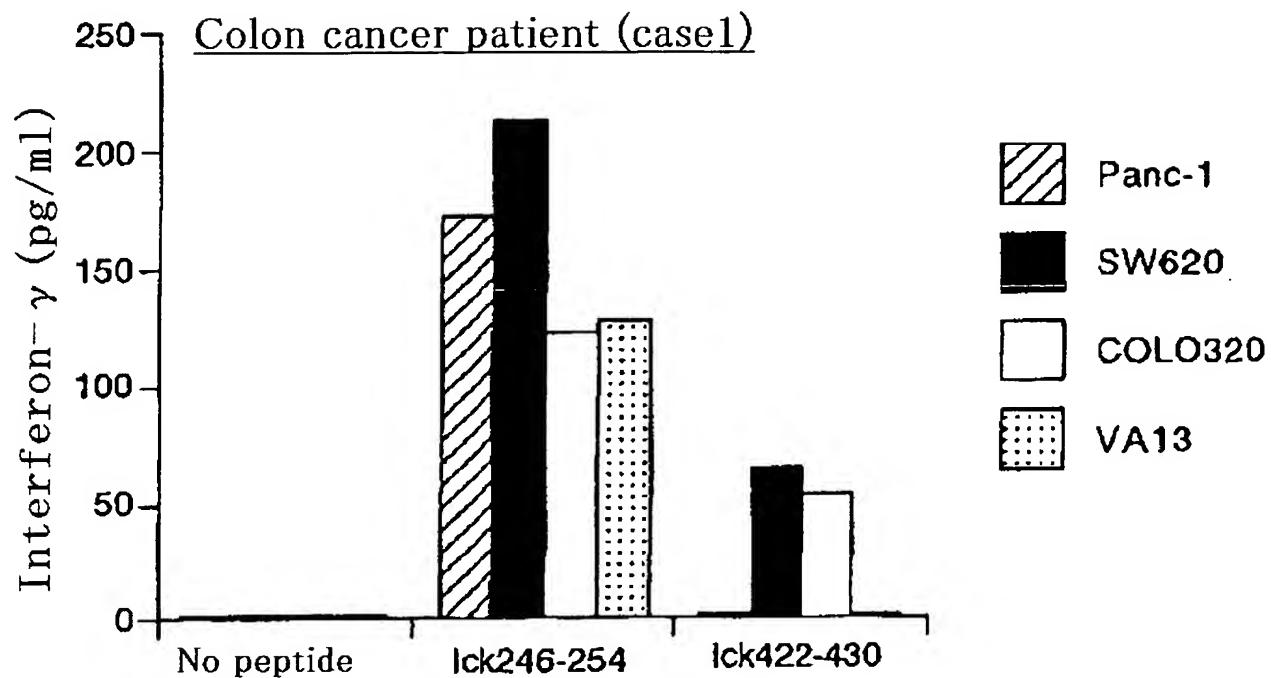
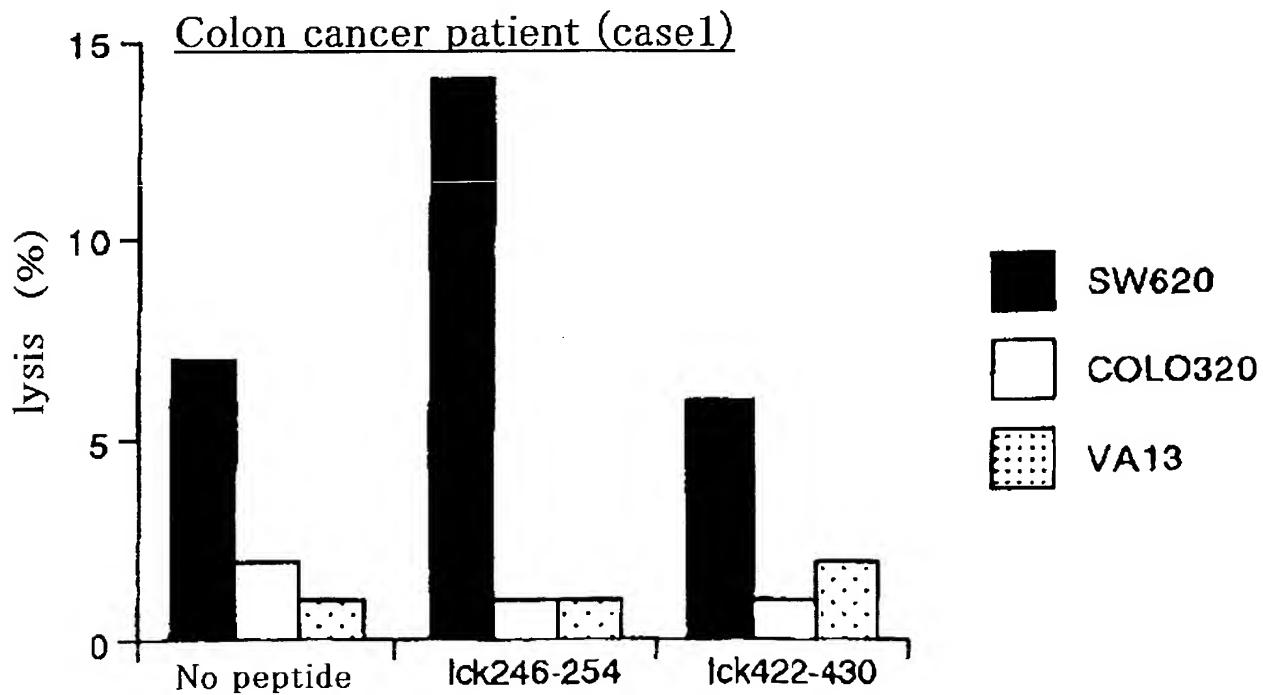


Fig.15

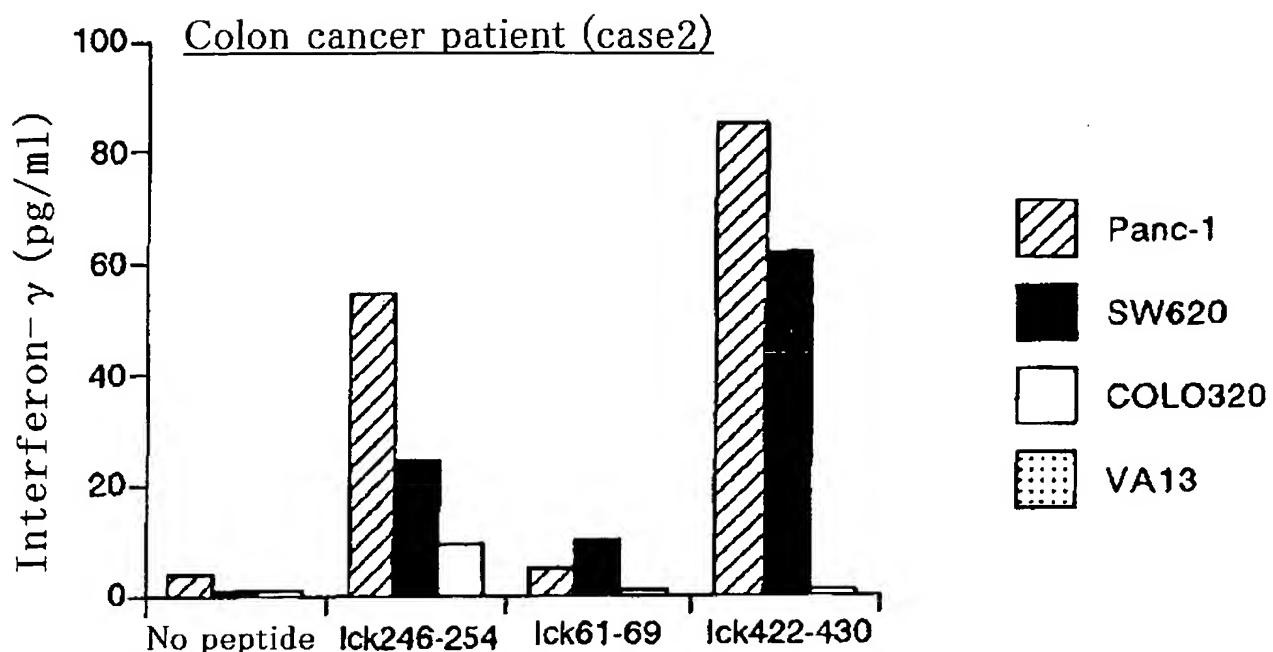
(A)



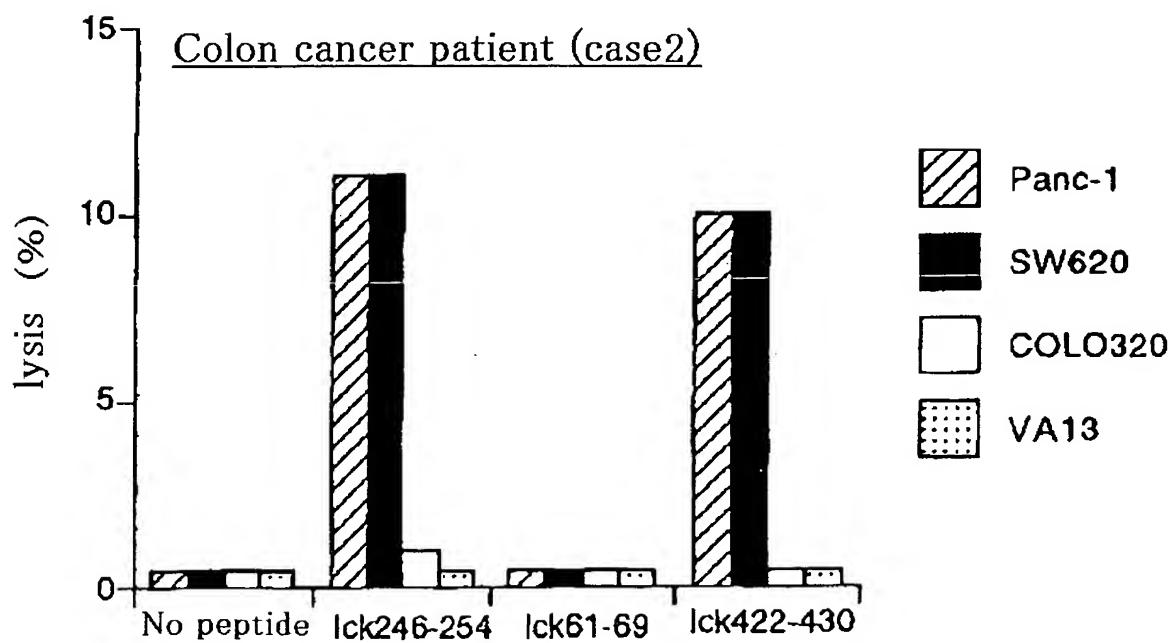
(B)



(C)



(D)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.